

**UNIVERSITE MOHAMMED V**

**FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE -RABAT-**

**ANNEE: 2009**

**THESE N °: 57**

# **DEGRADATION FORCEE DU DOCETAXEL**

**THESE**

*Présentée et soutenue publiquement le :.....*

**PAR**

**Mlle. Wafaa MOURADI**

*Née le 14 Juin 1983 à BENI MELLAL*

**Pour L'Obtention du Doctorat en Pharmacie**

**MOTS CLES: docetaxel – HPLC – test de stress – stabilité**

## **MEMBRES DE JURY**

**Mr.J. TAOUFIK**

Professeur de Chimie Thérapeutique

**PRESIDENT**

**Mr. Y. CHERRAH**

Professeur de Pharmacologie

**RAPPORTEUR**

**Mr. A. BOUKLOUZE**

Professeur des Applications Pharmaceutiques

**JUGES**

**Mr. A.FAOUZI**

Professeur Pharmacologique

سُبْحَانَكَ

لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا بِمَا عَلَّمْتَنَا

إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

(البقرة: من الآية 32)



UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI  
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT

**DOYENS HONORAIRES :**

1962 – 1969	: Docteur Abdelmalek FARAJ
1969 – 1974	: Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981	: Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989	: Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997	: Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003	: Professeur Abdelmajid BELMAHI

**ADMINISTRATION :**

Doyen :	Professeur Najia HAJJAJ
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et Etudiantines	Professeur Mohammed JIDDANE
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération	Professeur Naima LAHBABI-AMRANI
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie	Professeur Yahia CHERRAH
Secrétaire Général :	Monsieur Mohammed BENABDELLAH

**PROFESSEURS :**

**Décembre 1967**

1. Pr. TOUNSI Abdelkader	Pathologie Chirurgicale
--------------------------	-------------------------

**Février, Septembre, Décembre 1973**

2. Pr. ARCHANE My Idriss*	Pathologie Médicale
3. Pr. BENOMAR Mohammed	Cardiologie
4. Pr. CHAOUI Abdellatif	Gynécologie Obstétrique
5. Pr. CHKILI Taieb	Neuropsychiatrie

Janvier et Décembre 1976

6. Pr. HASSAR Mohamed

Pharmacologie Clinique

Février 1977

7. Pr. AGOUMI Abdelaziz

Parasitologie

8. Pr. BENKIRANE ép. AGOUMI Najia

Hématologie

9. Pr. EL BIED ép. IMANI Farida

Radiologie

Février Mars et Novembre 1978

10. Pr. ARHARBI Mohamed

Cardiologie

11. Pr. SLAOUI Abdelmalek

Anesthésie Réanimation

Mars 1979

12. Pr. LAMDOUAR ép. BOUAZZAOUI Naima

Pédiatrie

Mars, Avril et Septembre 1980

13. Pr. EL KHAMLICHI Abdeslam

Neurochirurgie

14. Pr. MESBAHI Redouane

Cardiologie

Mai et Octobre 1981

15. Pr. BENOMAR Said\*

Anatomie Pathologique

16. Pr. BOUZOUBAA Abdelmajid

Cardiologie

17. Pr. EL MANOUAR Mohamed

Traumatologie-Orthopédie

18. Pr. HAMMANI Ahmed\*

Cardiologie

19. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih

Chirurgie Cardio-Vasculaire

20. Pr. SBIHI Ahmed

Anesthésie Réanimation

21. Pr. TAOBANE Hamid\*

Chirurgie Thoracique

### Mai et Novembre 1982

22. Pr. ABROUQ Ali*	Oto-Rhino-Laryngologie
23. Pr. BENOMAR M'hammed	Chirurgie-Cardio-Vasculaire
24. Pr. BENSOUDA Mohamed	Anatomie
25. Pr. BENOSMAN Abdellatif	Chirurgie Thoracique
26. Pr. CHBICHEB Abdelkrim	Biophysique
27. Pr. JIDAL Bouchaib*	Chirurgie Maxillo-faciale
28. Pr. LAHBABI ép. AMRANI Naïma	Physiologie

### Novembre 1983

29. Pr. ALAOUI TAHIRI Kébir*	Pneumo-phtisiologie
30. Pr. BALAFREJ Amina	Pédiatrie
31. Pr. BELLAKHDAR Fouad	Neurochirurgie
32. Pr. HAJJAJ ép. HASSOUNI Najia	Rhumatologie
33. Pr. SRAIRI Jamal-Eddine	Cardiologie

### Décembre 1984

34. Pr. BOUCETTA Mohamed*	Neurochirurgie
35. Pr. EL OUEDDARI Brahim El Khalil	Radiothérapie
36. Pr. MAAOUNI Abdelaziz	Médecine Interne
37. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi	Anesthésie -Réanimation
38. Pr. NAJI M'Barek *	Immuno-Hématologie
39. Pr. SETTAF Abdellatif	Chirurgie

### Novembre et Décembre 1985

40. Pr. BENJELLOUN Halima	Cardiologie
41. Pr. BENS Aid Younes	Pathologie Chirurgicale
42. Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa	Neurologie
43. Pr. IHRAI Hssain *	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale
44. Pr. IRAQI Ghali	Pneumo-phtisiologie
45. Pr. KZADRI Mohamed	Oto-Rhino-laryngologie

Janvier, Février et Décembre 1987

46. Pr. AJANA Ali	Radiologie
47. Pr. AMMAR Fanid	Pathologie Chirurgicale
48. Pr. CHAHED OUZZANI ép.TAOBANE Houria	Gastro-Entérologie
49. Pr. EL FASSY FHIRI Mohamed Taoufiq	Pneumo-phtisiologie
50. Pr. EL HAITEM Naïma	Cardiologie
51. Pr. EL MANSOURI Abdellah*	Chimie-Toxicologie Expertise
52. Pr. EL YAACOUBI Moradh	Traumatologie Orthopédie
53. Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah	Gastro-Entérologie
54. Pr. LACHKAR Hassan	Médecine Interne
55. Pr. OHAYON Victor*	Médecine Interne
56. Pr. YAHYAOUI Mohamed	Neurologie

Décembre 1988

57. Pr. BENHMAMOUCHE Mohamed Najib	Chirurgie Pédiatrique
58. Pr. DAFIRI Rachida	Radiologie
59. Pr. FAIK Mohamed	Urologie
60. Pr. FIKRI BEN BRAHIM Nouredine	Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
61. Pr. HERMAS Mohamed	Traumatologie Orthopédie
62. Pr. TOULOUNE Farida*	Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

63. Pr. ABIR ép. KHALIL Saadia	Cardiologie
64. Pr. ACHOUR Ahmed*	Chirurgicale
65. Pr. ADNAOUI Mohamed	Médecine Interne
66. Pr. AOUNI Mohamed	Médecine Interne
67. Pr. AZENDOUR BENACEUR*	Oto-Rhino-Laryngologie
68. Pr. BENAMEUR Mohamed*	Radiologie
69. Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali	Cardiologie
70. Pr. CHAD Bouziane	Pathologie Chirurgicale

- 71. Pr. CHKOFF Rachid
- 72. Pr. FARCHADO Fouzia ép.BENABDELLAH
- 73. Pr. HACHIM Mohammed\*
- 74. Pr. HACHIMI Mohamed
- 75. Pr. KHARBACH Aïcha
- 76. Pr. MANSOURI Fatima
- 77. Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda
- 78. Pr. SEDRATI Omar\*
- 79. Pr. TAZI Saoud Anas
- 80. Pr. TERHZAZ Abdellah\*

Pathologie Chirurgicale  
 Pédiatrique  
 Médecine-Interne  
 Urologie  
 Gynécologie -Obstétrique  
 Anatomie-Pathologique  
 Neurologie  
 Dermatologie  
 Anesthésie Réanimation  
 Ophtalmologie

Février Avril Juillet et Décembre 1991

- 81. Pr. AL HAMANY Zaitounia
- 82. Pr. ATMANI Mohamed\*
- 83. Pr. AZZOUZI Abderrahim
- 84. Pr. BAYAHIA ép. HASSAM Rabéa
- 85. Pr. BELKOUCHI Abdelkader
- 86. Pr. BENABDELLAH Chahrazad
- 87. Pr. BENCHEKROUN BELABBES Abdelatif
- 88. Pr. BENSOUDA Yahia
- 89. Pr. BERRAHO Amina
- 90. Pr. BEZZAD Rachid
- 91. Pr. CHABRAOUI Layachi
- 92. Pr. CHANA El Houssaine\*
- 93. Pr. CHERRAH Yahia
- 94. Pr. CHOKAIRI Omar
- 95. Pr. FAJRI Ahmed\*
- 96. Pr. JANATI Idrissi Mohamed\*
- 97. Pr. KHATTAB Mohamed
- 98. Pr. NEJMI Maati
- 99. Pr. OUAALINE Mohammed\*

Anatomie-Pathologique  
 Anesthésie Réanimation  
 Anesthésie Réanimation  
 Néphrologie  
 Chirurgie Générale  
 Hématologie  
 Chirurgie Générale  
 Pharmacie galénique  
 Ophtalmologie  
 Gynécologie Obstétrique  
 Biochimie et Chimie  
 Ophtalmologie  
 Pharmacologie  
 Histologie Embryologie  
 Psychiatrie  
 Chirurgie Générale  
 Pédiatrie  
 Anesthésie-Réanimation  
 Médecine Préventive, Santé Publique et

Hygiène

100. Pr. SOULAYMANI ép.BENCHEIKH Rachida

Pharmacologie

101. Pr. TAOUFIK Jamal

Chimie thérapeutique

### Décembre 1992

102. Pr. AHALLAT Mohamed

Chirurgie Générale

103. Pr. BENOUDA Amina

Microbiologie

104. Pr. BENSOUDA Adil

Anesthésie Réanimation

105. Pr. BOUJIDA Mohamed Najib

Radiologie

106. Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza

Gastro-Entérologie

107. Pr. CHAKIR Nouredine

Radiologie

108. Pr. CHRAIBI Chafiq

Gynécologie Obstetrique

109. Pr. DAOUDI Rajae

Ophtalmologie

110. Pr. DEHAYNI Mohamed\*

Gynécologie Obstétrique

111. Pr. EL HADDOURY Mohamed

Anesthésie Réanimation

112. Pr. EL OUAHABI Abdessamad

Neurochirurgie

113. Pr. FELLAT Rokaya

Cardiologie

114. Pr. GHAFIR Driss\*

Médecine Interne

115. Pr. JIDDANE Mohamed

Anatomie

116. Pr. OUZZANI TAIBI Med Charaf Eddine

Gynécologie Obstétrique

117. Pr. TAGHY Ahmed

Chirurgie Générale

118. Pr. ZOUHDI Mimoun

Microbiologie

### Mars 1994

119. Pr. AGNAOU Lahcen

Ophtalmologie

120. Pr. AL BAROUDI Saad

Chirurgie Générale

121. Pr. ARJI Moha\*

Anesthésie Réanimation

122. Pr. BENCHERIFA Fatiha

Ophtalmologie

123. Pr. BENJAAFAR Nouredine

Radiothérapie

124. Pr. BENJELLOUN Samir

Chirurgie Générale

125. Pr. BENRAIS Nozha

Biophysique

126. Pr. BOUNASSE Mohammed\*

Pédiatrie

127. Pr. CAOUI Malika

Biophysique

128. Pr. CHRAIBI Abdelmjid	Endocrinologie et Maladies Métabolique
129. Pr. EL AMRANI ép. AHALLAT Sabah	Gynécologie Obstétrique
130. Pr. EL AOUAD Rajae	Immunologie
131. Pr. EL BARDOUNI Ahmed	Traumatologie Orthopédie
132. Pr. EL HASSANI My Rachid	Radiologie
133. Pr. EL IDRISSE LAMGHARI Abdennaceur	Médecine Interne
134. Pr. EL KIRAT Abdelmajid*	Chirurgie Cardio- Vasculaire
135. Pr. ERROUGANI Abdelkader	Chirurgie Générale
136. Pr. ESSAKALI Malika	Immunologie
137. Pr. ETTAYEBI Fouad	Chirurgie Pédiatrique
138. Pr. HADRI Larbi*	Médecine Interne
139. Pr. HDA Ali*	Médecine Interne
140. Pr. HASSAM Badredine	Dermatologie
141. Pr. IFRINE Lahssan	Chirurgie Générale
142. Pr. JELTHI Ahmed	Anatomie Pathologique
143. Pr. MAHFOUD Mustapha	Traumatologie Orthopédie
144. Pr. MOUDENE Ahmed*	Traumatologie Orthopédie
145. Pr. MOSSEDDAQ Rachid*	Neurologie
146. Pr. OULBACHA Said	Chirurgie Générale
147. Pr. RHRAB Brahim	Gynécologie Obstétrique
148. Pr. SENOUCI ép. BELKHADIR Karima	Dermatologie
149. Pr. SLAOUI Anas	Chirurgie Cardio-vasculaire

### Mars 1994

150. Pr. ABBAR Mohamed*	Urologie
151. Pr. ABDELHAK M'barek	Chirurgie - Pédiatrique
152. Pr. BELAIDI Halima	Neurologie
153. Pr. BARHMI Rida Slimane	Gynécologie Obstétrique
154. Pr. BENTAHILA Abdelali	Pédiatrie
155. Pr. BENYAHIA Mohammed Ali	Gynécologie -Obstétrique
156. Pr. BERRADA Mohamed Saleh	Traumatologie -Orthopédie
157. Pr. CHAMI Ilham	Radiologie

158. Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae	Ophtalmologie
159. Pr. EL ABBADI Najja	Neurochirurgie
160. Pr. HANINE Ahmed*	Radiologie
161. Pr. JALIL Abdelouahed	Chirurgie Générale
162. Pr. LAKHDAR Amina	Gynécologie Obstétrique
163. Pr. MOUANE Nezha	Pédiatrie

### Mars 1995

164. Pr. ABOUQUAL Redouane	Réanimation Médicale
165. Pr. AMRAOUI Mohamed	Chirurgie Générale
166. Pr. BAIDADA Abdelaziz	Gynécologie Obstétrique
167. Pr. BARGACH Samir	Gynécologie Obstétrique
168. Pr. BELLAHNECH Zakaria	Urologie
169. Pr. BEDDOUCHE Amoqrane*	Urologie
170. Pr. BENZAOUZ Mustapha	Gastro-Entérologie
171. Pr. CHAARI Jilali*	Médecine Interne
172. Pr. DIMOU M'barek*	Anesthésie Réanimation
173. Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine*	Anesthésie Réanimation
174. Pr. EL MESNAOUI Abbas	Chirurgie Générale
175. Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila	Oto-Rhino-Laryngologie
176. Pr. FERHATI Driss	Gynécologie Obstétrique
177. Pr. HASSOUNI Fadil	Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
178. Pr. HDA Abdelhamid*	Cardiologie
179. Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed	Urologie
180. Pr. IBRAHIMY Wafaa	Ophtalmologie
182. Pr. BENOMAR ALI	Neurologie
183. Pr. BOUGTAB Abdesslam	Chirurgie Générale
184. Pr. ER RIHANI Hassan	Oncologie Médicale
185. Pr. EZZAITOUNI Fatima	Néphrologie
186. Pr. KABBAJ Najat	Radiologie
187. Pr. LAZRAK Khalid (M)	Traumatologie Orthopédie
188. Pr. OUTIFA Mohamed*	Gynécologie Obstétrique

### Décembre 1996

189. Pr. AMIL Touriya*	Radiologie
190. Pr. BELKACEM Rachid	Chirurgie Pédiatrie
191. Pr. BELMAHI Amin	Chirurgie réparatrice et plastique
192. Pr. BOULANOUAR Abdelkrim	Ophtalmologie
193. Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan	Chirurgie Générale
194. Pr. EL MELLOUKI Ouafae*	Parasitologie
195. Pr. GAMRA Lamiae	Anatomie Pathologique
196. Pr. GAOUZI Ahmed	Pédiatrie
197. Pr. MAHFOUDI M'barek*	Radiologie
198. Pr. MOHAMMADINE EL Hamid	Chirurgie Générale
199. Pr. MOHAMMADI Mohamed	Médecine Interne
200. Pr. MOULINE Soumaya	Pneumo-phtisiologie
201. Pr. OUADGHIRI Mohamed	Traumatologie – Orthopédie
202. Pr. OUZEDDOUN Naima	Néphrologie
203. Pr. ZBIR EL Mehdi*	Cardiologie

### Novembre 1997

204. Pr. ALAMI Mohamed Hassan	Gynécologie – Obstétrique
205. Pr. BEN AMAR Abdesselem	Chirurgie Générale
206. Pr. BEN SLIMANE Lounis	Urologie
207. Pr. BIROUK Nazha	Neurologie
208. Pr. BOULAICH Mohamed	O.RL.
209. Pr. CHAOUIR Souad*	Radiologie
210. Pr. DERRAZ Said	Neurochirurgie
211. Pr. ERREIMI Naima	Pédiatrie
212. Pr. FELLAT Nadia	Cardiologie
213. Pr. GUEDDARI Fatima Zohra	Radiologie
214. Pr. HAIMEUR Charki*	Anesthésie Réanimation
215. Pr. KADDOURI Nouredine	Chirurgie – Pédiatrique
216. Pr. KANOUNI NAWAL	Physiologie

217. Pr. KOUTANI Abdellatif	Urologie
218. Pr. LAHLOU Mohamed Khalid	Chirurgie Générale
219. Pr. MAHRAOUI CHAFIQ	Pédiatrie
220. Pr. NAZZI M'barek*	Cardiologie
221. Pr. OUAHABI Hamid*	Neurologie
222. Pr. SAFI Lahcen*	Anesthésie Réanimation
223. Pr. TAOUFIQ Jallal	Psychiatrie
224. Pr. YOUSFI MALKI Mounia	Gynécologie Obstétrique

#### Novembre 1998

225. Pr. BENKIRANE Majid*	Hématologie
226. Pr. KHATOURI Ali*	Cardiologie
227. Pr. LABRAIMI Ahmed*	Anatomie Pathologique

#### Novembre 1998

228. Pr. AFIFI RAJAA	Gastro - Entérologie
229. Pr. AIT BENASSER MOULAY Ali*	Pneumo-phtisiologie
230. Pr. ALOUANE Mohammed*	Oto- Rhino- Laryngologie
231. Pr. LACHKAR Azouz	Urologie
232. Pr. LAHLOU Abdou	Traumatologie Orthopédie
233. Pr. MAFTAH Mohamed*	Neurochirurgie
234. Pr. MAHASSINI Najat	Anatomie Pathologique
235. Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae	Pédiatrie
236. Pr. MANSOURI Abdelaziz*	Neurochirurgie
237. Pr. NASSIH Mohamed*	Stomatologie Et Chirurgie Maxillo Faciale
238. Pr. RIMANI Mouna	Anatomie Pathologique
239. Pr. ROUIMI Abdelhadi	Neurologie

#### Janvier 2000

240. Pr. ABID Ahmed*	Pneumo-phtisiologie
241. Pr. AIT OUMAR Hassan	Pédiatrie

242. Pr. BENCHERIF My Zahid	Ophtalmologie
243. Pr. BENJELLOUN DAKHAMA Badr.Sououd	Pédiatrie
244. Pr. BOURKADI Jamal-Eddine	Pneumo-phtisiologie
245. Pr. CHAOUI Zineb	Ophtalmologie
246. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI AI Montacer	Chirurgie Générale
247. Pr. ECHARRAB EI Mahjoub	Chirurgie Générale
248. Pr. EL FTOUH Mustapha	Pneumo-phtisiologie
249. Pr. EL MOSTARCHID Brahim*	Neurochirurgie
250. Pr. EL OTMANYAzzedine	Chirurgie Générale
251. Pr. GHANNAM Rachid	Cardiologie
252. Pr. HAMMANI Lahcen	Radiologie
253. Pr. ISMAILI Mohamed Hatim	Anesthésie-Réanimation
254. Pr. ISMAILI Hassane*	Traumatologie Orthopédie
255. Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss	Gastro-Entérologie
256. Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*	Anesthésie-Réanimation
257. Pr. TACHINANTE Rajae	Anesthésie-Réanimation
258. Pr. TAZI MEZALEK Zoubida	Médecine Interne

### Novembre 2000

259. Pr. AIDI Saadia	Neurologie
260. Pr. AIT OURHROUIL Mohamed	Dermatologie
261. Pr. AJANA Fatima Zohra	Gastro-Entérologie
262. Pr. BENAMR Said	Chirurgie Générale
263. Pr. BENCHEKROUN Nabiha	Ophtalmologie
264. Pr. BOUSSELMANE Nabile*	Traumatologie Orthopédie
265. Pr. BOUTALEB Najib*	Neurologie
266. Pr. CHERTI Mohammed	Cardiologie
267. Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma	Anesthésie-Réanimation
268. Pr. EL HASSANI Amine	Pédiatrie
269. Pr. EL IDGHIRI Hassan	Oto-Rhino-Laryngologie
270. Pr. EL KHADER Khalid	Urologie
271. Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*	Rhumatologie

272. Pr. GHARBI Mohamed El Hassan	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
273. Pr. HSSAIDA Rachid*	Anesthésie-Réanimation
274. Pr. MANSOURI Aziz	Radiothérapie
275. Pr. OUZZANI CHAHDI Bahia	Ophtalmologie
276. Pr. RZIN Abdelkader*	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
277. Pr. SEFIANI Abdelaziz	Génétique
278. Pr. ZEGGWAGH Amine Ali	Réanimation Médicale

### **PROFESSEURS AGREGES :**

#### **Décembre 2001**

279. Pr. ABABOU Adil	Anesthésie-Réanimation
280. Pr. AOUAD Aicha	Cardiologie
281. Pr. BALKHI Hicham*	Anesthésie-Réanimation
282. Pr. BELMEKKI Mohammed	Ophtalmologie
283. Pr. BENABDELJLIL Maria	Neurologie
284. Pr. BENAMAR Loubna	Néphrologie
285. Pr. BENAMOR Jouda	Pneumo-phtisiologie
286. Pr. BENELBARHDADI Imane	Gastro-Entérologie
287. Pr. BENNANI Rajae	Cardiologie
288. Pr. BENOUACHANE Thami	Pédiatrie
289. Pr. BENYOUSSEF Khalil	Dermatologie
290. Pr. BERRADA Rachid	Gynécologie Obstétrique
291. Pr. BEZZA Ahmed*	Rhumatologie
292. Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi	Anatomie
293. Pr. BOUHOUCHE Rachida	Cardiologie
294. Pr. BOUMDIN El Hassane*	Radiologie
295. Pr. CHAT Latifa	Radiologie
296. Pr. CHELLAOUI Mounia	Radiologie
297. Pr. DAALI Mustapha*	Chirurgie Générale
298. Pr. DRISSI Sidi Mourad*	Radiologie
299. Pr. EL HAJOUI Ghziel Samira	Gynécologie Obstétrique
300. Pr. EL HIJRI Ahmed	Anesthésie-Réanimation

301. Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid	Neuro-Chirurgie
302. Pr. EL MADHI Tarik	Chirurgie-Pédiatrique
303. Pr. EL MOUSSAIF Hamid	Ophtalmologie
304. Pr. EL OUNANI Mohamed	Chirurgie Générale
305. Pr. EL QUESSAR Abdeljlil	Radiologie
306. Pr. ETTAIR Said	Pédiatrie
307. Pr. GAZZAZ Miloudi*	Neuro-Chirurgie
308. Pr. GOURINDA Hassan	Chirurgie-Pédiatrique
309. Pr. HRORA Abdelmalek	Chirurgie Générale
310. Pr. KABBAJ Saad	Anesthésie-Réanimation
311. Pr. KABIRI EL Hassane*	Chirurgie Thoracique
312. Pr. LAMRANI Moulay Omar	Traumatologie Orthopédie
313. Pr. LEKEHAL Brahim	Chirurgie Vasculaire Périphérique
314. Pr. MAHASSIN Fattouma*	Médecine Interne
315. Pr. MEDARHRI Jalil	Chirurgie Générale
316. Pr. MIKDAME Mohammed*	Hématologie Clinique
317. Pr. MOHSINE Raouf	Chirurgie Générale
318. Pr. NABIL Samira	Gynécologie Obstétrique
319. Pr. NOUINI Yassine	Urologie
320. Pr. OUALIM Zouhir*	Néphrologie
321. Pr. SABBAH Farid	Chirurgie Générale
322. Pr. SEFIANI Yasser	Chirurgie Vasculaire Périphérique
323. Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia	Pédiatrie
324. Pr. TAZI MOUKHA Karim	Urologie

### Décembre 2002

325. Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*	Anatomie Pathologique
326. Pr. AMEUR Ahmed*	Urologie
327. Pr. AMRI Rachida	Cardiologie
328. Pr. AOURARH Aziz*	Gastro-Entérologie
329. Pr. BAMOU Youssef *	Biochimie-Chimie
330. Pr. BELGHITI Laila	Gynécologie Obstétrique

331. Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
332. Pr. BENBOUAZZA Karima	Rhumatologie
333. Pr. BENZEKRI Laila	Dermatologie
334. Pr. BENZZOUBEIR Nadia*	Gastro – Enterologie
335. Pr. BERADY Samy*	Médecine Interne
336. Pr. BERNOUSSI Zakiya	Anatomie Pathologique
337. Pr. BICHRHA Mohamed Zakarya	Psychiatrie
338. Pr. CHOHO Abdelkrim *	Chirurgie Générale
339. Pr. CHKIRATE Bouchra	Pédiatrie
340. Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair	Chirurgie Pédiatrique
341. Pr. EL ALJ Haj Ahmcd	Urologie
342. Pr. EL BARNOUSSI Leila	Gynécologie Obstétrique
343. Pr. EL HAOURI Mohamed *	Dermatologie
344. Pr. EL MANSARI Omar*	Chirurgie Générale
345. Pr. ES-SADEL Abdelhamid	Chirurgie Générale
346. Pr. FILALI ADIB Abdelhai	Gynécologie Obstétrique
347. Pr. HADDOUR Leila	Cardiologie
348. Pr. HAJJI Zakia	Ophtalmologie
349. Pr. IKEN Ali	Urologie
350. Pr. ISMAEL Farid	Traumatologie Orthopédie
351. Pr. JAAFAR Abdeloihab*	Traumatologie Orthopédie
352. Pr. KRIOULE Yamina	Pédiatrie
353. Pr. LAGHMARI Mina	Ophtalmologie
354. Pr. MABROUK Hfid*	Traumatologie Orthopédie
355. Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*	Gynécologie Obstétrique
356. Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*	Cardiologie
357. Pr. MOUSTAINE My Rachid	Traumatologie Orthopédie
358. Pr. NAITLHO Abdelhamid*	Médecine Interne
359. Pr. OUJILAL Abdelilah	Oto-Rhino-Laryngologie
360. Pr. RACHID Khalid *	Traumatologie Orthopédie
361. Pr. RAISS Mohamed	Chirurgie Générale
362. Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*	Pneumo-phtisiologie

- 363. Pr. RHOU Hakima
- 364. Pr. RKIOUAK Fouad\*
- 365. Pr. SIAH Samir \*
- 366. Pr. THIMOU Amal
- 367. Pr. ZENTAR Aziz\*
- 368. Pr. ZRARA Ibtisam\*

- Néphrologie
- Endocrinologie et Maladies Métaboliques
- Anesthésie Réanimation
- Pédiatrie
- Chirurgie Générale
- Anatomie Pathologique

#### Janvier 2004

- 369. Pr. ABDELLAH El Hassan
- 370. Pr. AMRANI Mariam
- 371. Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
- 372. Pr. BENKIRANE Ahmed\*
- 373. Pr. BENRAMDANE Larbi\*
- 374. Pr. BOUGHALEM Mohamed\*
- 375. Pr. BOULAADAS Malik
- 376. Pr. BOURAZZA Ahmed\*
- 377. Pr. CHERRADI Nadia
- 378. Pr. EL FENNI Jamal\*
- 379. Pr. EL HANCI Zaki
- 380. Pr. EL KHORASSANI Mohamed
- 381. Pr. EL YOUNASSI Badreddine\*
- 382. Pr. HACHI Hafid
- 383. Pr. JABOUIRIK Fatima
- 384. Pr. KARMANE Abdelouahed
- 385. Pr. KHABOUZE Samira
- 386. Pr. KHARMAZ Mohamed
- 387. Pr. LEZREK Mohammed\*
- 388. Pr. MOUGHIL Said
- 389. Pr. NAOUMI Asmae\*
- 390. Pr. SAADI Nozha
- 391. Pr. SASSENOU Ismail\*
- 392. Pr. TARIB Abdelilah\*

- Ophtalmologie
- Anatomie Pathologique
- Oto-Rhino-Laryngologie
- Gastro-Entérologie
- Chimie Analytique
- Anesthésie Réanimation
- Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
- Neurologie
- Anatomie Pathologique
- Radiologie
- Gynécologie Obstétrique
- Pédiatrie
- Cardiologie
- Chirurgie Générale
- Pédiatrie
- Ophtalmologie
- Gynécologie Obstétrique
- Traumatologie Orthopédie
- Urologie
- Chirurgie Cardio-Vasculaire
- Ophtalmologie
- Gynécologie Obstétrique
- Gastro-Entérologie
- Pharmacie Clinique

393. Pr. TIJAMI Fouad

Chirurgie Générale

394. Pr. ZARZUR Jamila

Cardiologie

Janvier 2005

395. Pr. ABBASSI Abdelah

Chirurgie Réparatrice et Plastique

396. Pr. AL KANDRY Sif Eddine\*

Chirurgie Générale

397. Pr. ALAOUI Ahmed Essaid

Microbiologie

398. Pr. ALLALI fadoua

Rhumatologie

399. Pr. AMAR Yamama

Néphrologie

400. Pr. AMAZOUZI Abdellah

Ophtalmologie

401. Pr. AZIZ Nouredine\*

Radiologie

402. Pr. BAHIRI Rachid

Rhumatologie

403. Pr. BARAKAT Amina

Pédiatrie

404. Pr. BENHALIMA Hanane

Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale

405. Pr. BENHARBIT Mohamed

Ophtalmologie

406. Pr. BENYASS Aatif

Cardiologie

407. Pr. BERNOUSSI Abdelghani

Ophtalmologie

408. Pr. BOUKALATA Salwa

Radiologie

409. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed

Ophtalmologie

410. Pr. DOUDOUH Abderrahim\*

Biophysique

411. Pr. EL HAMZAOUI Sakina

Microbiologie

412. Pr. HAJJI Leila

Cardiologie

413. Pr. HESSISEN Leila

Pédiatrie

414. Pr. JIDAL Mohamed\*

Radiologie

415. Pr. KARIM Abdelouahed

Ophtalmologie

416. Pr. KENDOUSI Mohamed\*

Cardiologie

417. Pr. LAAROUSSI Mohamed

Chirurgie Cardio Vasculaire

418. Pr. LYACOUBI Mohammed

Parasitologie

419. Pr. NIAMANE Radouane\*

Rgumatologie

420. Pr. RAGALA Abdelhak

Gynécologie Obstétrique

421. Pr. REGRAGUI Asmaa

Anatomie Pathologique

422. Pr. SBIHI Souad

Histo Embryologie Cytogénétique

423. Pr. TNACHERI OUAZZANI Btissam

Ophtalmologie

424. Pr. ZERAIDI Najja

Gynécologie Obstétrique

Avril 2006

425. Pr. ACHEMLAL Lahsen\*

Rhumatologie

426. Pr. AFIFI Yasser

Dermatologie

427. Pr. AKJOUJ Said\*

Radiologie

428. Pr. BELGNAOUI Fatima Zahra

Dermatologie

429. Pr. BELMEKKI Abdelkader\*

Hématologie

430. Pr. BENCHEIKH Razika

O.R.L

431. Pr. BIYI Abdelhamid\*

Biophysique

432. Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine

Chirurgie – Pédiatrique

433. Pr. BOULAHYA Abdellatif\*

Chirurgie Cardio-Vasculaire

434. Pr. CHEIKHAOUI Younes

Chirurgie Cardio-Vasculaire

435. Pr. CHENGUETI ANSARI Anas

Gynécologie Obstétrique

436. Pr. DOGHMI Nawal

Cardiologie

437. Pr. ESSAMRI Wafaa

Gastro-Entérologie

438. Pr. FELLAT Ibtissam

Cardiologie

439. Pr. FAROUDY Mamoun

Anesthésie Réanimation

440. Pr. GHADOUANE Mohammed\*

Urologie

441. Pr. HARMOUICHE Hicham

Médecine Interne

442. Pr. HNAFI Sidi Mohamed\*

Anesthésie Réanimation

443. Pr. IDRIS LAHLOU Amine

Microbiologie

444. Pr. JROUNDI Laila

Radiologie

445. Pr. KARMOUNI Tariq

Urologie

446. Pr. KILI Amina

Pédiatrie

447. Pr. KISRA Hassan

Psychiatrie

448. Pr. KISRA Mounir

Chirurgie – Pédiatrique

449. Pr. KHARCHAFI Aziz\*

Médecine Interne

450. Pr. LMIMOUNI Badreddine\*

Parasitologie

451. Pr. MANSOURI Hamid\*

Radiothérapie

452. Pr. NAZIH Naoual

O.R.L

453. Pr; OUANASS Abderrazzak  
454. Pr. SAFI Soumaya\*  
455. Pr. SEKKAT Fatima Zahra  
456. Pr. SEFIANI Sana  
457. Pr. SOUALHI Mouna  
458. Pr. ZAHRAOUI Rachida

Psychiatrie  
Endocrinologie  
Psychiatrie  
Anatomie Pathologique  
Pneumo-Phtisiologie  
Pneumo-Phtisiologie

## **ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES**

### **PROFESSEURS**

1. Pr. ALAMI OUHABI Naima  
2. Pr. ALAOUI KATIM  
3. Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naima  
4. Pr. ANSAR M'hammed  
5. Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz  
6. Pr. BOURJOUANE Mohamed  
7. Pr. DRAOUI Mustapha  
8. Pr. EL GUESSABI Lahcen  
9. Pr. ETTAIB Abdelkader  
10. Pr. FAOUZI Moulay El Abbes  
11. Pr. HMAMOUCHE Mohamed  
12. Pr. REDHA Ahlam  
13. Pr. TELLAL Saida\*  
14. Pr. TOUATI Driss  
15. Pr. ZELLOU Amina

Biochimie  
Pharmacologie  
Histologie – Embryologie  
Chimie Organique et Pharmacie Chimique  
Applications Pharmaceutiques  
Microbiologie  
Chimie Analytique  
Pharmacognosie  
Zootechnie  
Pharmacologie  
Chimie Organique  
Biochimie  
Biochimie  
Pharmacognosie  
Chimie Organique

\* *Enseignants Militaires*



***DEDICACES***

 *Je dédie cette thèse ...* 



***A ma très chère mère***

*Aucun travail ne sera en mesure d'exprimer ma profonde et sincère reconnaissance pour les efforts et les sacrifices d'une mère aimante et attentive.*

*Aucun mot, aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur, l'ampleur de l'affection et de l'admiration que j'éprouve pour vous.*

*Mon diplôme vous appartient. Que Dieu vous garde et vous accorde longue vie afin que je puisse à mon tour vous combler.*



***A la mémoire de mon père***

*J'aurais tant aimé que vous soyez à mes côtés ce jour. Aucune dédicace ne serait exprimer mon amour éternel et mon chagrin en exposant cette thèse en votre absence.*

*Ni la mort ni le temps ne vous feraient oublier. Que votre âme repose en paix.*



***A ma chère sœur Houda***

*Quoique que je dise je ne pourrai jamais te remercier pour  
Tout le soutien que tu m'as apporté tout le long de  
mes études*

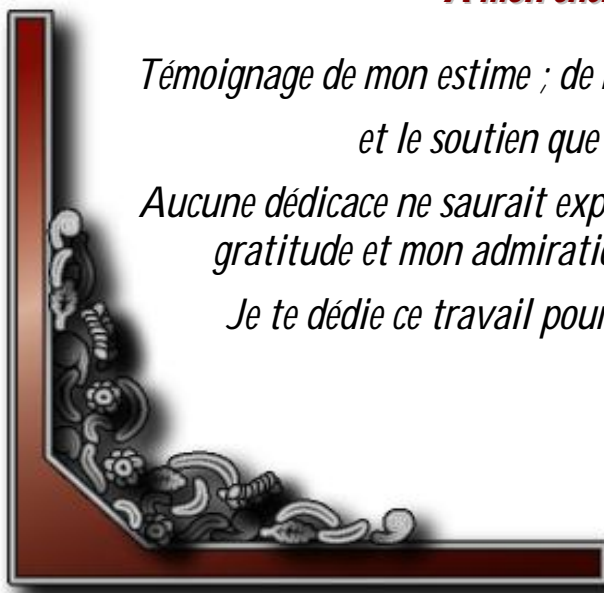
*Que cette thèse soit pour toi un faible témoignage de tout  
L'amour que j'ai pour toi*

***A mon cher frère hicham***

*Que ce travail soit un témoignage de mes sentiments  
les plus chers que j'ai pour toi.*

*Que Dieu te protège et t'accorde un brillant avenir avec  
une vie pleine de joie, de bonheur et de succès.*

***A mon cher fiancé Amine***



*Témoignage de mon estime ; de ma reconnaissance pour l'encouragement  
et le soutien que tu m'as toujours apporté.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur mon respect ; ma  
gratitude et mon admiration pour tes qualités humaines.*

*Je te dédie ce travail pour témoigner ma profonde affection.*



***A ma tante **SOUAD** et mon oncle **SIMOHAMMED*****

*Je vous dédie mon travail qui traduit ma  
gratitude et mes sincères remerciements pour votre bienveillance.*

*Que dieu vous accorde, ainsi que votre famille, santé,  
bonheur et prospérité*

***A la famille **AL ANDALOUSSI, MOURADI,  
LOUDIYI et JAAYBI*****

*Je vous dédie ce fruit de plusieurs années avec mon affection  
et mon respect.*





***A mes chères amies Fatima Zahra, Noura, Sofia ....***

*En témoignage de notre éternelle amitié et en souvenir des  
Années merveilleuses passés ensemble et qui seront gravés  
Dans ma mémoire à jamais, avec toute mon affection,  
mon estime et mon dévouement.*

*Je vous souhaite beaucoup de succès dans votre  
vie familiale et professionnelle.*

***A mes amis et collègues***


*Puisse ce travail vous assurer l'expression de ma sincère amitié avec mes  
souhails de succès et de bonheur.*



***A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer.***




***REMERCIEMENTS***




*A Notre maître et président  
de JURY*  
**MONSIEUR LE PROFESSEUR**  
**J. TAOUFIK**  
*Professeur de Chimie Thérapeutique*

*C'est pour nous un grand Honneur que vous  
nous faites en acceptant de présider  
le jury de notre thèse.*

*Veillez trouver dans ce travail, l'expression  
de notre profonde gratitude, de nos remerciements  
les plus sincères et de notre respect.*






*A notre maître et rapporteur de thèse*  
**MONSIEUR LE PROFESSEUR**  
**Y. CHERRAH**  
*Professeur de pharmacologie*

*Vous nous avez confié ce travail et vous nous avez  
aidé minutieusement avec compétence,  
amabilité et patience.*

*Votre gentillesse, votre modestie et vos qualités humaines  
n'ont d'égal que votre compétence.*

*Veillez accepter, Monsieur, l'expression de nos  
sincères remerciements et notre profonde  
reconnaissance.*



A decorative corner ornament in the top right corner, featuring a dark red L-shaped border with intricate, ornate scrollwork and floral patterns in the inner corner.

*A notre maître et juge de thèse*  
**MONSIEUR LE PROFESSEUR**

***A. BOUKLOUZE***


*Professeur des applications pharmaceutiques*

*Nous vous remercions vivement pour l'honneur  
que vous nous faites  
en acceptant de juger ce travail.*

*Nous sommes très sensibles à votre gentillesse  
et à votre accueil très aimable.*

*Veillez croire en nos sentiments les plus respectueux.*

A decorative corner ornament in the bottom left corner, identical in style to the one in the top right, featuring a dark red L-shaped border with intricate, ornate scrollwork and floral patterns in the inner corner.



*A notre maître et juge de thèse*  
**MONSIEUR LE PROFESSEUR**  
**M. A. FAOUZI**  
*Professeur de pharmacologie*

*Nous sommes très touchés par l'honneur que vous  
nous faites en acceptant de juger  
notre travail.*

*C'est pour nous l'occasion de vous témoigner notre  
estime et notre profonde reconnaissance.*





***Au Docteur AZOUGHAR***

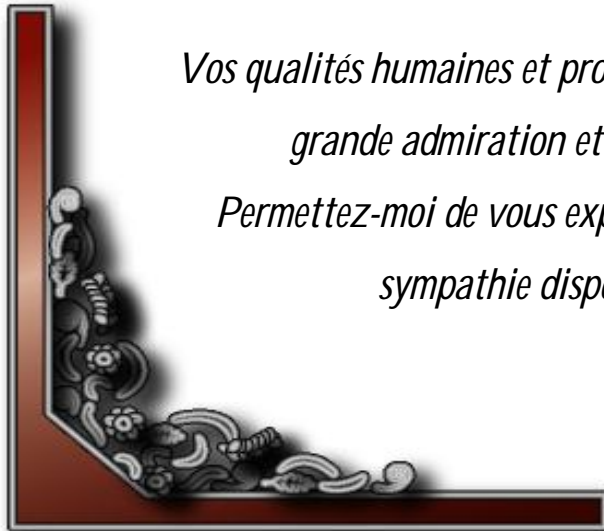
***Chef de service de LNCM***

*Votre compétence, l'étendue de votre savoir et votre rigueur au travail n'ont d'égal que votre modestie débordante.*

*Veillez trouver dans ce travail le témoignage de ma sincère reconnaissance et mes vifs remerciements pour votre aide précieuse que vous m'avez porté pour la réalisation de ce travail.*

***Au Docteur Y. RAMLI***

***Analyste au LNCM***



*Vos qualités humaines et professionnelles m'inspirent la plus grande admiration et une vive reconnaissance.*

*Permettez-moi de vous exprimer mon estime pour votre sympathie disponibilité constante*



***Au Docteur A . OUALI***

***Analyste au LNCM***

*Votre contribution particulière à la réalisation de ce travail a  
été inestimable malgré vos occupations.*

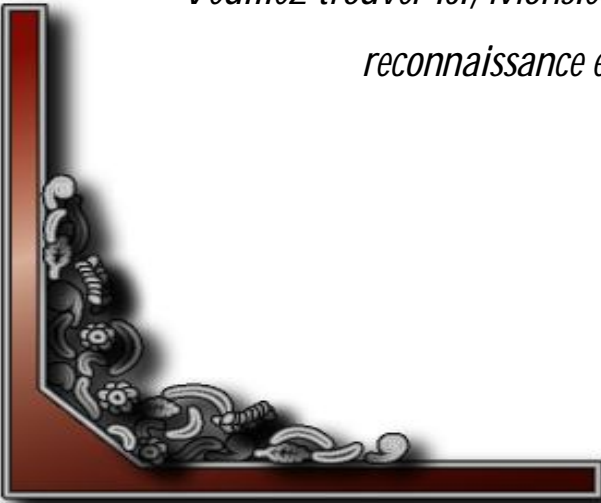
*Merci pour l'aide précieuse que vous m'avez apporté*

***Au Docteur M. EL KABRANE***

***Analyste au LNCM***

*Nous vous remercions de votre contribution pour parfaire ce travail  
malgré vos occupations multiples.*

*Veillez trouver ici, Monsieur, l'expression de notre sincère  
reconnaissance et de notre respect.*





***A Zineb ALAMI***

***Pharmacienne résidente***

***En pharmacie***

*Votre aide était précieuse pour la finalisation de ce travail.*

*Je suis très touchée par votre amabilité et votre soutien.*

*Veillez trouver ici le témoignage  
de ma sincère reconnaissance et mes vifs remerciements*

***A S. SDERFIQUI***

***Pharmacienne résidente***

***En pharmacie***

*Votre aide était précieuse pour la réalisation de ce travail.*

*Veillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et  
mes vifs remerciements*



---

# **LISTES DES ABREVIATIONS, TABLEAUX ET FIGURES**

---

## Liste des abréviations

<b>AIBN</b>	: <i>Azo-bisiso-butyronitrile</i>
<b>AMBD</b>	: Défaut Absolu de la Masse Balance
<b>CHO-K1</b>	: Ovaire d'hamster chinois
<b>DAD</b>	: Détecteur à la barrette de photodiode
<b>HGPRT</b>	: hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
<b>HR</b>	: Humidité Relative
<b>IARC</b>	: Centre International de Recherche sur le Cancer
<b>ICH</b>	: Conférence International d'Harmonisation
<b>ISO</b>	: Organisation internationale de normalisation
<b>MP</b>	: matière première
<b>PhRMA</b>	: Pharmaceutical Research and Manufacturer's Association
<b>PF</b>	: Produit fini
<b>RMBD</b>	: Défaut Relatif de la Masse Balance
<b>RMN</b>	: Résonance Magnétique Nucléaire
<b>RP-HPLC</b>	: Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse
<b>SCR</b>	: Substance chimique de référence
<b>SM</b>	: Spectrométrie de Masse

## Liste des tableaux

Tableau I : Médicaments anticancéreux potentiellement cancérogènes.....	14
Tableau II : Vitesses de dégradation relatives à 25°C selon la cinétique d'Arrhénius et l'énergie d'activation $E_a$ .....	28
Tableau III : Augmentation de la vitesse relative de la réaction de dégradation en fonction de la température selon la cinétique d'Arrhénius et l'énergie d'activation $E_a$ .....	29
Tableau IV : Co-solvants organiques utilisés dans les études de test de stress .	32
Tableau V : Conditions opératoires proposées pour l'étude de dégradation du principe actif .....	42
Tableau VI : Conditions opératoires proposées pour l'étude de dégradation du produit fini .....	43
Tableau VII : Conditions typiques de stress pour les études préliminaires .....	47
Tableau VIII : Conditions de stress maximales proposées pour les substances actives à l'état solide.....	48
Tableau IX : Conditions de stress maximales proposées pour les substances actives sous forme de solutions ou de suspensions.....	49
Tableau X : Résultats des essais préliminaires de dégradation forcée de Docetaxel .....	82
<b>Tableau XI</b> : Résultats des essais de dégradation hydrolytique et oxydative de Docetaxel en tant que matière première .....	90

Tableau XII : Résultats des essais de dégradation forcée thermolytique et photolytique de Docetaxel en tant que matière première .....	90
Tableau XIII : Résultat de l'analyse chromatographique d'un échantillon rassemblant les essais dégradés par la chaleur la lumière et la base.....	91
<b>Tableau XIV</b> : Résultats des essais de la dégradation forcée du Docetaxel (MP) .....	91
Tableau XV : Résultats de l'analyse chromatographique d'un échantillon rassemblant les essais dégradés par la chaleur, la lumière et la base.....	92
Tableau XVI : Résultats des essais de dégradation forcée hydrolytique et oxydative du produit fini .....	104
Tableau XVII : Résultats des essais de dégradation forcée thermolytique et photolytique du produit fini .....	104
Tableau XVIII : résultats du placebo subissant une dégradation photolytique, thermolytique et hydrolytique par NaOH.....	104
Tableau XIX : Résultats des essais de la dégradation forcée appliquée sur le produit fini .....	105
Tableau XX : les produits de dégradation générés à la fois par les conditions de stress et en étudiant la stabilité du docetaxel à long terme. ....	105
<b>Tableau XXI</b> : la variation des différentes concentrations du produit fini en fonction des aires correspondantes .....	123
Tableau XXII : la valeur de la moyenne, de l'écart type et de la variance calculée pour les différentes concentrations .....	124

## Liste des chromatogrammes

Chromatogramme 1 : Résultats de l'analyse du blanc par la troisième méthode chromatographique .....	74
Chromatogramme 2 : Résultats de l'analyse de l'essai non dégradé de la matière première par la première méthode chromatographique .....	74
Chromatogramme 3 : Résultats de l'analyse de l'essai non dégradé de la matière première par la troisième méthode chromatographique .....	75
Chromatogramme 4 : Résultats de l'analyse du standard (1g/L) par la troisième méthode chromatographique .....	76
Chromatogramme 5 : Résultats de l'analyse chromatographique du placebo par la troisième méthode chromatographique.....	77
Chromatogramme 6 : Résultats de l'analyse des essais non dégradés du produit fini par la troisième méthode chromatographique .....	78
Chromatogramme 7 : Résultats de l'analyse de l'essai non dégradé du produit fini 1g/l par la troisième méthode chromatographique.....	79
Chromatogramme 8 : Résultats de l'analyse de l'essai non dégradé du produit fini 4g/l par la troisième méthode chromatographique.....	80
<b>Chromatogramme 9,10,11:</b> Résultats de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradée (étude préliminaire) .....	83
<b>Chromatogramme 12,13,14 :</b> Résultats de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradée (étude préliminaire).....	84

<b>Chromatogramme 15,16,17</b> : Résultats de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradée (étude préliminaire).....	86
<b>Chromatogramme 18,19,20</b> : Résultats de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradée (étude préliminaire).....	87
<b>Chromatogramme 21</b> : Résultats de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradée (étude préliminaire) .....	88
Chromatogramme 22,23,24 : Résultats de l'analyse chromatographique du blanc dégradé par NaOH, la lumière, et la chaleur séparément .....	93
Chromatogramme 25,26 : Résultat de l'analyse chromatographique du blanc dégradé par HCl et le H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> séparément .....	94
Chromatogramme 27 : Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par 0.8 ml de NaOH 0.05N. ....	95
Chromatogramme 28: Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par 0.6 ml de NaOH 0.05N. ....	96
Chromatogramme 29: Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par 0.5 ml de HCl 0.1N. ....	97
Chromatogramme 30: Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par 0.2 ml de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> %.....	98
Chromatogramme 31 : Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par la lumière UV/VISIBLE pendant 19h.....	99
Chromatogramme 32: Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par la lumière UV/VISIBLE pendant 24h.....	100
Chromatogramme 33 : Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par la chaleur pendant 10h.....	101

Chromatogramme 34 : résultat de l'analyse chromatographique d'un échantillon rassemblant les essais dégradés par la chaleur la lumière et la base .....	102
Chromatogramme 35 : Résultats de l'analyse chromatographique du placebo dégradé par la chaleur pendant 6h et la lumière UV/VISIBLE pendant 16h séparément.....	106
Chromatogramme 36 : Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai du produit fini dégradé par 0.6 ml de NaOH 0.05N .....	107
Chromatogramme 37 : Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par 0.5 ml de HCl 0.1N .....	108
Chromatogramme 38: Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par la lumière UV/Visible pendant 16h .....	109
Chromatogramme 39: Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par la chaleur pendant 4h.....	110
Chromatogramme 40 : Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par la chaleur pendant 6h.....	111
Chromatogramme 41 : résultat de l'analyse chromatographique d'un essai du produit fini de concentration 0.05%.....	117
Chromatogramme 42 : résultat de l'analyse chromatographique d'un essai du produit fini de concentration 5%.....	118
Chromatogramme 43 : résultat de l'analyse chromatographique d'un essai du produit fini de concentration 7.5%.....	119
Chromatogramme 44 : résultat de l'analyse chromatographique d'un essai du produit fini de concentration 1%.....	120

Chromatogramme 45 : résultat de l'analyse chromatographique d'un essai du produit fini de concentration 1.5%.....	121
Chromatogramme 46 : résultat de l'analyse chromatographique d'un essai du produit fini de concentration 2%.....	122

# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>0</b>
<b>PARTIE THEORIQUE</b> .....	<b>4</b>
<b>Chapitre 1 : Généralités</b> .....	<b>5</b>
I. Origine du Docetaxel .....	6
II. Description du Docetaxel .....	7
III. Pharmacologie et toxicologie du Docetaxel .....	9
IV. Sécurité de manipulation des anticancéreux .....	14
<b>Chapitre 2 : Etude de la dégradation forcée</b> .....	<b>16</b>
I. Historique.....	17
II. Intérêt de l'étude de la dégradation forcée .....	21
III. Stabilité intrinsèque .....	25
IV. Etapes de la dégradation forcée .....	46
V. La notion «Masse balance» .....	51
<b>Chapitre 3 : Développement de la méthode d'analyse</b> .....	<b>53</b>
<b>PARTIE PRATIQUE</b> .....	<b>56</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>57</b>
<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>59</b>
I. Matériel.....	60
II. Méthodes .....	62
<b>Résultats</b> .....	<b>71</b>

I. Données expérimentales .....	72
II. Résultats de la dégradation forcée .....	73
III. Développement et pré-validation de la méthode d'analyse du Docetaxel .....	115
<b>Discussion .....</b>	<b>127</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>138</b>
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>141</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>148</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>153</b>

---

# **INTRODUCTION**

---

Selon les statistiques publiées récemment en 2006, les cas de cancer sont en augmentation continue atteignant jusqu'à 50.000 cas par an au Maroc. Les types de cancer les plus fréquents chez l'homme sont le poumon, le cavum et la prostate, tandis que chez la femme, le cancer du sein et de l'utérus [1].

Dès le début de son évolution, un cancer peut donner des métastases à distance. Ainsi, il échappe aux traitements locaux (chirurgie, radiothérapie). D'où le traitement par chimiothérapie.

Les traitements des cancers par la chimiothérapie ont pour but principal d'enrayer une telle évolution [2].

Parmi les principaux médicaments utilisés dans la chimiothérapie, on cite le Docetaxel qui est actuellement approuvé dans plus de 90 pays pour traiter 5 pathologies cancéreuses différentes : cancers du sein, des poumons, de la prostate, de l'estomac et des voies aéro-digestives supérieures. [3]

Le Docetaxel se présente en différentes spécialités : le princeps TAXOTERE® et ses génériques LEXUS®, DOCETAXEL COOPER®, OKA DOCETAXEL®, DOCETAXEL WINTHROP®.

Dans le but de maîtriser les données de stabilité d'une molécule active en vue de réussir la formulation galénique et de préciser les conditions de stockage ultérieures, l'industrie pharmaceutique procède à l'étude de la dégradation forcée.

Cette étude fournit des informations nécessaires pour le développement d'une méthode d'analyse de la molécule concernée telle que la méthode chromatographique liquide à haute performance (HPLC).

Dans la littérature, une méthode HPLC est décrite pour détecter le Docetaxel dans le plasma humain et dans les urines [4]. Le Docetaxel est également analysé dans le plasma humain par spectrométrie de masse en tandem [5].

Par ailleurs, *Rao et ses collaborateurs* ont développé une méthode analytique indicatrice de stabilité du Docetaxel utilisant la HPLC [6].

Notre présent travail a été effectué au sein de la division du Laboratoire National de Contrôle de Médicaments de la Direction du Médicament et de la Pharmacie de Rabat service physico-chimie. Il consiste à l'étude de la dégradation forcée du Docetaxel (matière première et produit fini). Cette étude est effectuée dans le but de développer une méthode HPLC indicative de stabilité du Docetaxel.

Ce travail est divisé en deux parties : une partie théorique et une partie pratique.

La partie théorique est constituée de trois chapitres. Dans un premier chapitre intitulé « Généralités », nous allons noter l'origine du Docetaxel puis le décrire du point de vue chimique, ainsi que ses caractères organoleptiques.

Nous allons présenter la spécialité Princeps du Docetaxel à savoir le TAXOTERE®, ses présentations sur le marché, sa composition et ses modalités de conservation. Puis, nous allons mettre l'accent sur les propriétés pharmacologiques et toxicologiques du Docetaxel en précisant son mécanisme d'action, ses caractéristiques pharmaco- cinétiques, ses indications, ses contre-indications, les effets indésirables, les interactions médicamenteuses et sa toxicologie.

De part leur cytotoxicité et afin d'assurer la sécurité de l'opérateur, la manipulation des anticancéreux nécessite des mesures de précaution qui seront précisées dans un autre paragraphe.

Dans le deuxième chapitre, nous allons décrire la méthodologie de conduite d'une étude de dégradation forcée de la matière première et du produit fini. Quant au troisième chapitre, nous y expliquerons la stratégie adoptée pour le développement d'une méthode indicative de stabilité.

Dans La deuxième partie consacrée à l'aspect pratique de notre travail, nous allons préciser l'objectif de notre travail, le matériel utilisé, décrire la méthodologie de travail adoptée pour l'étude de la dégradation forcée du Docetaxel et le développement d'une méthode indicative de la stabilité de cette molécule, et enfin présenter nos résultats.

---

# **PARTIE THEORIQUE**

---

Chapitre 1 : Généralités

Chapitre 2 : Etude de la dégradation forcée

Chapitre 3 : Développement de la méthode d'analyse

# ***Chapitre 1 : Généralités***

---

## I. Origine du Docetaxel

Au début des années 1960, l'Institut du cancer Américain, ou « National Cancer Institute » a lancé un vaste programme de recherche sur les nouveaux agents anticancéreux. C'est alors que le paclitaxel, qui présente une activité cytotoxique importante, a été découvert par Wani et Taylor qui ont procédé à son isolement et à l'identification de sa structure à partir de l'extrait de l'écorce de l'If du pacifique (*Taxus brevifolia*). Le développement de cette nouvelle molécule est néanmoins très lent en raison de problèmes d'approvisionnement et d'extraction et de la survenue de réactions d'hypersensibilité lors des premiers essais cliniques menés en 1983.

Les travaux du Professeur Potier du Centre National de Recherche Scientifique Français en association avec différents centres de recherche et de développement se sont orientés vers les constituants chimiques de l'If d'Europe à la recherche de principes actifs issus de sources renouvelables.

De très nombreuses molécules ont été isolées et étudiées. Un composé actif possédant des caractéristiques intéressantes a été isolé des feuilles de l'If (les aiguilles). Il s'agissait de la 10-déacétyl-baccatine III. A partir de cette molécule, plusieurs essais d'hémi-synthèse ont été réalisés. Il a été possible d'obtenir le Docetaxel [7,8].

## II. Description du Docetaxel

### 1. Nom chimique

Le Docetaxel a pour nom chimique :

(2b,5b,7b,10b,13a)-4-acetoxy-13-(((2R,3S)-3-((tertbutoxy-carbonyl)amino)-2-hydroxy-3-phenylpropanoyl)oxy)-1,7,10-trihydroxy-9-oxo-5,20-epoxytax-11-en-2-yl benzoate. [9]

### 2. Structure chimique

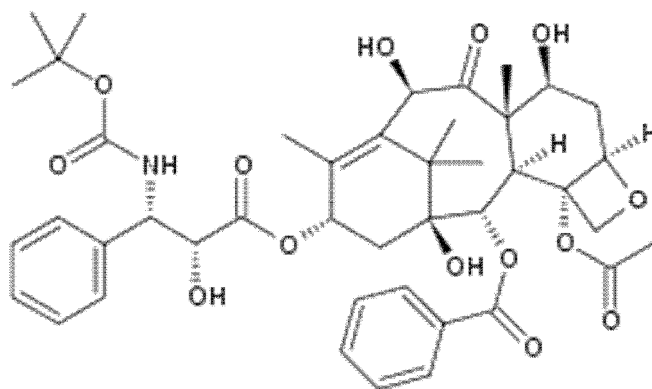


Figure 1 : Structure chimique du Docetaxel [9]

### **3. Caractères organoleptiques**

Le Docetaxel se présente sous deux formes : une forme tri hydratée et une forme anhydre.

- Docetaxel, tri hydraté est une poudre cristalline blanche avec une formule brute  $C_{43}H_{53}NO_{14}, 3H_2O$  et un poids moléculaire de 861,9.
- Docetaxel anhydre est une poudre microcristalline blanche avec une formule brute  $C_{43}H_{53}NO_{14}$ , et un poids moléculaire de 807,9.

Le Docetaxel est très lipophile et pratiquement insoluble dans l'eau.

### **4. Présentation et conservation**

Sur le marché, on retrouve le Docetaxel commercialisé initialement sous le nom de spécialité TAXOTERE® (Spécialité Princeps) par les Laboratoires Aventis. Le TAXOTERE® se présente sous forme d'une solution, destinée pour injection, concentrée, visqueuse, limpide et de couleur jaune à jaune-brunâtre.

Deux présentations aux dosages de 20 et 80mg sont disponibles :

- **TAXOTERE® 20 mg, injectable** : Flacon contenant 20 mg de Docetaxel (anhydre) dans 0,5 ml de polysorbate 80, et un autre « diluant » contenant 1,98 mL d'éthanol à 13 % dans de l'eau pour injection.

- **TAXOTERE® 80 mg, injectable** : Flacon contenant 80 mg de Docetaxel (anhydre) dans 2 mL de polysorbate 80, et un autre « diluant » contenant 7,33 mL d'éthanol à 13 % dans de l'eau pour injection.

Les flacons non ouverts de TAXOTERE® sont stables jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'emballage, quand ils sont conservés entre 2 et 25°C, à l'abri de la lumière. La congélation n'endommage pas le produit.

La solution pré mélangée du TAXOTERE® doit être utilisée dès que possible après la préparation. Cependant, la stabilité chimique et physique de cette solution demeure inchangée pendant 8 heures lorsque celle-ci est conservée à une température se situant entre 2 et 8 °C [10].

### **III. Pharmacologie et toxicologie du Docetaxel**

#### **1. Mécanisme d'action**

Appartenant à la classe pharmaco-thérapeutique des cytostatiques, le Docetaxel est un agent antinéoplasique qui agit en favorisant l'assemblage de la tubuline en microtubules stables et en inhibant leur dépolymérisation conduisant à une diminution marquée de la tubuline libre. La fixation du Docetaxel aux microtubules ne modifie pas le nombre de protofilaments.

In vivo, il paraît que Docetaxel présente un large spectre antitumoral vis-à-vis des tumeurs greffées avancées, d'origine murine ou humaine.

## **2. Caractéristiques pharmacocinétiques**

La cinétique du Docetaxel est indépendante de la dose et correspond à un modèle à trois compartiments, avec des demi-vies de 4 minutes, 36 minutes et 11,1 heures pour les phases alpha,  $\beta$  et gamma, respectivement.

Les valeurs moyennes de la clairance totale et du volume de distribution à l'équilibre étaient respectivement égales à 21 l/h/m<sup>2</sup> et 113 L. Le Docetaxel se lie à plus de 95 % aux protéines plasmatiques.

Le Docetaxel s'élimine en sept jours dans les urines et les fèces sous forme de métabolites inactifs et de très faibles quantités de produit inchangé, après un processus de métabolisme oxydatif lié au cytochrome P450 du groupement ester tertio-butylique.

## **3. Indications**

- Cancer du sein
- Cancer du poumon non à petites cellules
- Cancer de la prostate
- Cancer gastrique
- Cancer des voies aéro-digestives supérieures

#### 4. Contre-indications

- Hypersensibilité à la substance active ou à l'un des excipients.
- Neutropénie : le Docetaxel ne doit pas être utilisé chez les patients dont le nombre initial de neutrophiles est  $< 1500/\text{mm}^3$ .
- Grossesse et allaitement : le Docetaxel ne doit pas être administré chez la femme enceinte ou qui allaite.
- En absence de données disponibles, le Docetaxel ne doit pas être administré aux patients présentant une insuffisance hépatique sévère.

#### 5. Effets indésirables

- *Effets hématologiques :*  
La neutropénie est l'effet indésirable le plus fréquent.
- *Réactions d'hypersensibilité :*  
Les réactions sévères apparaissent pendant la première et la seconde perfusion, telles qu'une hypotension sévère, un bronchospasme ou un rash/érythème généralisé.
- *Rétention hydrique sévère :*  
Telle que pleurésie, péricardite et ascite.
- *Effets sur le système nerveux (toxicité neurosensorielle) :*  
Caractérisés par des paresthésies, des dysesthésies ou des sensations douloureuses à type de brûlure.

- *Effets cardiaques :*

Une insuffisance cardiaque a été observée chez des patientes recevant du *Docetaxel* en association avec d'autres anticancéreux.

- *Effets gastro-intestinaux sévères :*

Tels que douleurs et sensibilité abdominale précoce, fièvre, diarrhée.

- *Affections de la peau et du tissu sous-cutané :*

Éruption, prurit, desquamation et des troubles unguéaux sévères caractérisés par une hypo ou une hyperpigmentation des ongles et parfois une onycholyse. Le *Docetaxel* peut entraîner également une alopecie.

- *Affections hépatobiliaires :*

De très rares cas d'hépatites, parfois fatales.

La sévérité des effets indésirables du *Docetaxel* peut être majorée lors de l'association avec d'autres cytotoxiques.

## **6. Interactions médicamenteuses**

Des études in vitro ont montré que le métabolisme du *Docetaxel* peut être modifié par l'administration concomitante de composés qui induisent ou inhibent le cytochrome P450-3A tels que la ciclosporine, la terféndine, le kétoconazole, l'érythromycine et la troléandomycine.

Les données disponibles suggèrent une éventuelle interaction entre le Docetaxel et le carboplatine. Associé au Docetaxel, la clairance du carboplatine augmente de plus de 50 % [11].

## **7. Toxicologie**

La génotoxicité du Docetaxel a fait l'objet d'épreuves biologiques in vitro et in vivo. Le Docetaxel était dépourvu d'activité mutagène à la suite des épreuves de mutation inverse sur bactéries (test d'Ames) et de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT) sur des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO-K1). Cependant, au cours du test d'aberration chromosomique sur cellules CHO-K1, le Docetaxel a provoqué l'augmentation du nombre de cellules aneuploïdes, mais s'est révélé dépourvu d'activité clastogène. Durant le test in vivo du micronoyau, le Docetaxel a fait augmenter le nombre d'érythrocytes polychromatiques micronucléés dans la moelle osseuse. La présence plus fréquente de cellules micronucléées, aneuploïdes et polyploïdes peut être liée à l'activité pharmacologique du Docetaxel qui inhibe la dépolymérisation des microtubules [10].

#### IV. Sécurité de manipulation des anticancéreux

Les médicaments anticancéreux ont une action sur la cellule cancéreuse mais également sur la cellule saine. Les risques liés à leur manipulation sont connus. Certains effets sont immédiats, d'autres peuvent apparaître après une exposition chronique. D'après le Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC), plusieurs substances anticancéreuses sont classées carcinogènes pour l'homme (catégorie 1) (**Tableau I**) [12,13,14].

**Tableau I:** Médicaments anticancéreux potentiellement cancérogènes

Catégorie 1	Catégorie 2A	Catégorie 2B
Chlorambucil	Adriamycine	Amsacrine
Cyclophosphamide	Cisplatine	Bléomycine
Melphalan	BCNU	Dacarbazine
Myleran	CCNU	
MOOP	Etoposide	
Thiotepa	Procarbazine	
Treosulphan		

Plusieurs études ont montré l'effet mutagène particulièrement sur les lymphocytes circulants des sujets professionnellement exposés. Des fréquences élevées d'effets toxiques sur la reproduction ont également été rapportées (avortement, prématurité, malformations congénitales et infertilité) chez des infirmières et pharmaciennes préparant les chimiothérapies anticancéreuses.

Les recommandations internationales actuelles préconisent la manipulation des produits anticancéreux dans des locaux sécurisés et une protection du personnel opérateur par une tenue adéquate (habillage de protection, gants, lunette, masque,...).

Toutes les opérations de dilution et de pesée doivent être effectuées sous des hottes à flux d'air laminaire vertical. La surface de travail est protégée par un papier absorbant.

Après chaque manipulation, la balance, le matériel de pesée et la paillasse de travail doivent être nettoyés par l'isopropanol.

La verrerie de travail est traitée en premier par NaOH 5% pendant 10 min puis lavée à l'eau.

La collecte des déchets de la manipulation se fait dans un sac en plastique déposé sous la hotte. Les déchets contaminés sont destinés à l'incinération tandis que les rejets liquides doivent suivre un circuit spécifique après leur collection dans des bidons sous une autre hotte **[15, 16,17]**.

## ***Chapitre 2 : Etude de la dégradation forcée***

---

L'étude de la dégradation forcée consiste à imposer au produit certaines conditions de stress plus drastiques que celles employées lors des études de stabilité à long terme ou accélérées, telles que *la température, l'humidité, le pH, la lumière et l'oxydation*.

L'objectif de l'étude de la dégradation forcée est d'obtenir le maximum de dégradation en générant des impuretés potentielles, sans toutefois entraîner les processus de dégradation secondaire, Ce qui permettra de développer une méthode de recherche de ces produits de dégradation ainsi formés [18].

### **I. Historique**

En industrie pharmaceutique, les termes "test de stress" et "test de stabilité accéléré" sont souvent utilisés dans la stabilité du médicament et la prévision de sa durée de vie [19].

*Kennon et al.* [20] ont montré l'effet de la température élevée (jusqu'à 85° C) sur les taux de dégradation de produits pharmaceutiques ce qui permet de prévoir la durée de vie du produit.

Puis, *Yang* [21] et *Witthaus* [22] et leurs collaborateurs ont démontré que 3 mois à 40°C et 75% d'humidité relative est à peu près l'équivalent de 24 mois à température ambiante. Ces conditions ont été alors adoptées par la FDA (Food and Drug Administration) des USA.

Connu historiquement sous le nom de « rule of thumb », le travail de *Carstensen* [19] montre que 5 semaines de stockage à 42°C sont équivalentes à 2 ans de conservation à température ambiante.

*Singh et Bakshi* [23] ont montré que les conditions de stress acide et basique peuvent être très variables engendrant des taux de dégradation également très variables :

- HCl 0.1N à 40°C pendant une semaine (avec une dégradation négligeable),
- HCl 0.1N à 65°C pendant 21 jours (71.6% de dégradation)
- HCl 0.1N à 105°C pendant 2 mois (dégradation considérable)
- HCl 4N pendant 2 jours (66% dégradation)
- HCl 6.5N à 108°C pendant 24 heures (50% dégradation)
- HCl concentré à température ambiante (56.5% dégradation)
- NaOH 0.1N à 40°C pendant une semaine (dégradation négligeable)
- NaOH 0.1N à 65°C pendant 21 jours (100% de dégradation)
- NaOH 0.1N pendant 2 jours (68% de dégradation)
- NaOH 1N pendant 3 jours (7.2% de dégradation)
- NaOH 5N pendant 4 heures (100% de dégradation)

Les études de dégradation par l'oxydation au peroxyde d'hydrogène à une concentration variable de 0.3% à 30% à température élevée ont été souvent effectuées. Par exemple, 3% de peroxyde à 37°C pour 6h (60% de dégradation), 3% de peroxyde à 50°C pour 72h (6.6% de dégradation), ou peroxyde 10% pour 6h donne une (dégradation non significative).

Ainsi, *Singh et Bakshi* ont remarqué qu'il existe une variation considérable en ce qui concerne les conditions de stress. En effet, il est indispensable de déterminer la durée de l'exposition, le taux de dégradation et la température suffisante pour mettre fin à l'exposition au stress. Ils ont constaté également que les conditions du test de stress varient considérablement d'un composé à un autre.

En 1992, *Boccardi* [24] a indiqué que la plupart des produits pharmaceutiques subissent une auto-oxydation et que le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  n'est pas un très bon réactif pour imiter ce processus. BOCCARDI était le premier qui a décrit l'utilisation d'un radical initiateur : l'Azo-bis-IsoButyroNitrile (AIBN) pour le test de stress par l'oxydation.

En 1998, *Weiser* [25] a démontré le rôle du test de stress dans le développement de la méthode analytique. C'est ainsi qu'il a proposé une série de conditions pour la réalisation des tests de stress.

En 2000, *Singh et Bakshi* [26] décrivent un système de classification des composés selon leur sensibilité aux conditions de stress (Extrêmement labile, très labile, labile, stable).

En 2001, *Alsante et al.* [27] ont suggéré la définition des limites des conditions de stress. A titre d'exemple, il est proposé d'utiliser une solution d'acide chlorhydrique HCl 1N et basique de NaOH 1N pour une semaine au maximum à température ambiante.

En 2002, l'association des fabricants et de recherche pharmaceutique PhRMA (Pharmaceutical Research and Manufacturer's Association) précise les différents types de stress qui devraient être effectués sur les médicaments lors de l'étude de la dégradation forcée [28].

Des publications récentes des études de dégradation forcée révèlent qu'il existe une énorme variété dans les conditions employées, par conséquent, la dégradation forcée n'a pas un protocole général et bien précis pour sa réalisation. [29]

## **II. Intérêt de l'étude de la dégradation forcée**

L'étude de la dégradation forcée d'une molécule active constitue le principal outil utilisé pour prévoir les problèmes relatifs à sa stabilité.

L'évaluation de la stabilité d'une molécule nécessite le développement d'une méthode analytique appropriée (sélective et sensible).

En effet, la stabilité de la molécule active peut avoir une influence sur différents paramètres lors de la formulation du médicament. Il est donc important d'avoir recours à ces études pour une optimisation de la formulation galénique. Par ailleurs, les données relatives à la stabilité permettent de préciser la nature du conditionnement qu'il convient d'utiliser et de déterminer les conditions de stockage appropriées et la durée de vie.

Les études de dégradation forcée permettent également de prévoir le devenir du médicament au niveau de l'organisme (données de la pharmacocinétique) mais aussi dans l'environnement. En outre, ces études permettent aussi l'évaluation de la toxicité de la molécule.

### **1. Développement de la méthode d'analyse**

L'évaluation de la stabilité d'un composé nécessite une méthode analytique appropriée. Pour développer une méthode permettant la détection des produits de dégradation potentiels, il faut avoir recours aux études de dégradation forcée.

La stratégie de développement d'une méthode indicatrice de la stabilité est décrite dans le chapitre 3.

## **2. Développement du conditionnement**

Les informations acquises à partir de l'étude de la dégradation forcée seront utilisées pour le choix d'un conditionnement approprié. Elles permettent de déterminer la sensibilité du composé à l'hydrolyse, l'oxydation, la chaleur et la lumière.

A titre d'exemple, si un composé est sensible à l'hydrolyse, l'emballage doit être conçu de telle sorte qu'il protège la transmission de la vapeur d'eau de l'extérieur vers l'intérieur du conditionnement et qu'il assure une stabilité durant le stockage à long terme.

## **3. Détermination de la durée de vie et des conditions de stockage**

La détermination des conditions de stockage appropriées pour la matière première ou le produit fini nécessite une connaissance des conditions qui induisent la dégradation. La plupart de ces renseignements sont obtenus à partir des études de dégradation forcée combinées aux études de stabilité en temps accéléré. La prévision d'une durée de vie exacte est toutefois la mieux réalisée avec les données des études de stabilité à long terme.

#### **4. Evaluation de la toxicité**

Si les études du test de stress indiquent la formation de composés toxiques connus, des mesures doivent être prises dès le début pour éviter la formation de ces composés toxiques et pour développer une méthode analytique sensible pour les détecter et les quantifier d'une manière exacte.

Les études du test de stress peuvent également faciliter la génération et la séparation des produits de dégradation pour l'évaluation toxicologique, puisque la préparation synthétique est presque irréalisable.

#### **5. Maîtrise de la formulation**

La dégradation peut se produire également lors de la fabrication. La connaissance des conditions qui conduisent à la dégradation de la substance active peut aider à la conception des contrôles appropriés et des conditions convenables durant la fabrication ; Par exemple, si le composé est sensible à la dégradation à un pH acide et la fabrication nécessite un pH bas, l'utilisation d'un milieu acide sera évitée ou contrôlée plus attentivement pour minimiser la dégradation, tout en observant la dégradation durant la formulation.

Et si la substance s'oxyde facilement, il est impératif d'utiliser un gaz inerte lors de la fabrication.

## **6. Etude de pharmacocinétique**

Avant sa commercialisation, le devenir du médicament dans l'organisme (la pharmacocinétique) fait l'objet de plusieurs études englobant les étapes d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination.

Ces études fournissent l'identification des principaux métabolites, ce qui est difficile in vivo.

Dans ce cas, il est généralement plus facile de générer une grande quantité des produits de dégradation grâce au test de stress plutôt que de l'isoler in vivo, puisque ces derniers sont considérés comme des métabolites.

## **7. Impact sur l'environnement**

L'étude de la dégradation forcée d'une substance active permet de prévoir le devenir du médicament qui la contient dans l'environnement. En effet, l'information obtenue à partir du test de stress peut être utilisée pour la conception et l'interprétation de l'étude du médicament dans l'environnement. D'après cette étude, il est évident que la dégradation du médicament dans l'environnement est souvent similaire à la dégradation observée durant les études du test de stress. **[29]**

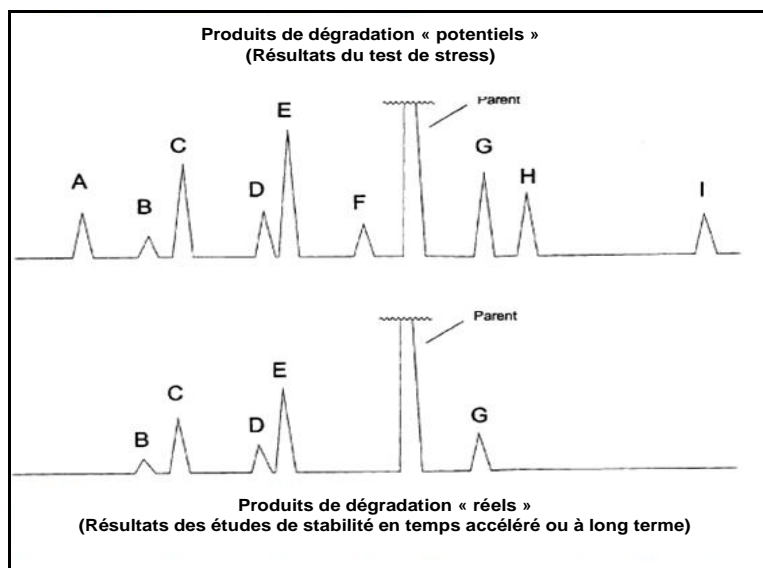
### **III. Stabilité intrinsèque**

Concevoir une étude de dégradation forcée d'une molécule c'est aussi rechercher les caractéristiques de sa stabilité intrinsèque. Le terme de « stabilité intrinsèque » est lié à 4 facteurs :

- Les conditions de stress engendrant la dégradation ;
- Les taux de dégradation ;
- Les structures des produits de dégradation majeurs ;
- Les voies de dégradation de la molécule.

#### **1. Les conditions de stress**

Le test de stress est une prévision de ce qu'il peut arriver sous les conditions de stockage. En effet, les produits de dégradation formés sous les conditions de stress sont des impuretés potentielles qui peuvent se former au cours du transport ou du stockage à long terme. Toutefois, s'il est démontré que ces impuretés ne se forment pas dans les conditions de stockage à long terme, le test de dégradation forcée ne sera pas nécessaire (**Figure 2**). [28]



**Figure 2 :** Illustration hypothétique de chromatogrammes des tests de stress et des études de stabilité en temps accéléré ou à long terme.

Les pics de A jusqu'à I représentent tous les produits de dégradation formés par les études de stress sous des conditions de stress variables. On parle de produits de dégradation « potentiels ».

Les pics B, C, D, E et G représentent les produits formés de façon significative lors des études de stabilité en temps accéléré ou à long terme.

Par ailleurs, dans le cadre de la mise au point de la validation des méthodes de recherche et de dosage des impuretés, il est souhaitable d'atteindre une dégradation correspondant à une perte de l'ordre de 5 à 30% du principe actif. Ce pourcentage va dépendre du nombre de pics détectés et au coefficient d'extinction des impuretés générées. Les conditions proposées seront alors ajustées dans ce but [30].

C'est la raison pour laquelle le test de stress devrait inclure les conditions qui provoquent spécialement plusieurs mécanismes de dégradation : dégradations thermolytique, hydrolytique, oxydative, et photolytique [31].

### **1.1. La dégradation thermolytique :**

Le mot « thermolytique » est utilisé pour décrire des réactions qui sont guidées par la chaleur. La dégradation thermolytique ou pyrolyse correspond à l'exposition à une température élevée, ce qui va provoquer la rupture des liaisons. Son mécanisme peut être considéré comme, hydrolyse, déshydratation, isomérisation, épimérisation, décarboxylation, réarrangement ou quelques types de réactions de polymérisation. [29]

La loi d'Arrhenius, énoncée par *Svante August Arrhenius* en 1889, a été utilisée dans le domaine de l'industrie pharmaceutique afin de prévoir le taux de dégradation d'un composé à l'état solide. La relation d'Arrhenius est probablement la plus couramment utilisée pour évaluer l'expression de la relation entre les taux des réactions et la température et pour donner ordre à la réaction :

$$\underline{k = A \cdot e^{\frac{-E_{\alpha}}{R \cdot T}}}$$

- K : Coefficient de vitesse, anciennement appelé "constante de vitesse".
- A : Facteur pré-exponentiel (appelé aussi facteur de fréquence) tenant compte de la fréquence des collisions et des effets stériques. Il ne dépend pas de la température.
- $E_a$  : Energie d'activation d'Arrhenius.
- T : Température (en Kelvin).
- R : Constante des gaz parfaits ( $R = 8,314\ 472\ \text{Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). [29,32]

La loi d'Arrhenius montre que les réactions ayant les énergies d'activation les plus faibles sont les plus rapides et vice versa.

**Tableau II** : Vitesses de dégradation relatives à 25°C selon la cinétique d'Arrhénus et l'énergie d'activation  $E_a$

Température (°C)	Vitesse relative $E_a = 12\ \text{kcal/mol}$	Vitesse relative $E_a = 15\ \text{kcal/mol}$	Vitesse relative $E_a = 20\ \text{kcal/mol}$
25	1	1	1
30	1.39	1.52	1.75
40	2.62	3.37	5.05
50	4.78	7.10	13.65
60	8.36	14.33	34.79
70	14.20	27.74	83.98

Le **Tableau II** montre que le coefficient de vitesse est multiplié par un facteur de 2 à 3 lorsque la température augmente de 10°C, c'est à dire que le taux de réaction double. [33]

**Tableau III** : Augmentation de la vitesse relative de la réaction de dégradation en fonction de la température selon la cinétique d'Arrhénius et l'énergie d'activation  $E_a$

Température (°C)	Augmentation de la vitesse de réaction		
	$E_a = 12 \text{ kcal/mol}$	$E_a = 15 \text{ kcal/mol}$	$E_a = 20 \text{ kcal/mol}$
25-30	1.39	1.52	1.75
30-40	1.88	2.22	2.89
40-50	1.82	2.11	2.71
50-60	1.75	2.02	2.55
60-70	1.70	1.94	2.41

Le **Tableau III** montre une augmentation du taux de réaction pour chaque augmentation de la température de 10°C, pour les mêmes énergies d'activation 12, 15, 20 Kcal/ mol.

D'après ces deux tableaux, il est évident que la température de stress a un grand effet sur le taux de dégradation pour une énergie d'activation particulière et que la vitesse de la réaction est dépendante de l'énergie d'activation.

Il est simple de calculer l'effet de la température sur le taux de la dégradation et d'estimer ce dernier à température ambiante, par exemple : si l'énergie d'activation est de 12Kcal/mol, le stress à 70°C pour 1 semaine serait à peu près le même que 100 jours à 25°C ( $14.2 \times 7 \text{ jours} = 99.4 \text{ jours}$ ). **[29]**

Les températures de stress sont en relation avec les conditions de stockage du principe actif :

- Produit conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  : température  $\geq 15^{\circ}\text{C}$
- Produit conservé à  $+5^{\circ}\text{C}$  : température  $\geq 35^{\circ}\text{C}$
- Produit conservé à une température comprise entre  $5^{\circ}\text{C}$  et  $30^{\circ}\text{C}$  : température  $\geq 50^{\circ}\text{C}$ . **[18,34,35]**

La condition maximale de stress est définie en tenant compte de la durée d'exposition. En effet, il est préférable de réaliser l'étude de dégradation sur une durée plus longue et à une température plus basse sans dépasser les  $80^{\circ}\text{C}$  car, des températures trop élevées risquent d'entraîner des processus de dégradation secondaires non représentatifs **[33]**.

**1.2. La dégradation hydrolytique :**

La réaction qui implique le contact avec l'eau est appelée hydrolyse. Cette dernière est affectée par le pH, le tampon, la force ionique, les solvants et d'autres agents tels que les complexants et les excipients. Ainsi, chacun de ces facteurs devra être individuellement examiné.

Les réactions d'hydrolyse sont généralement catalysées par l'acide ou la base. Ceci est particulièrement important lorsque le composé testé présente un groupement fonctionnel ionisable, lui permettant d'exister sous différents états d'ionisation. Cependant, le test de stress par hydrolyse doit s'effectuer sur un seul état de protonation du composé à tester, Il est tout de même inutile d'utiliser des milieux plus acides ou plus basiques car cela va accélérer l'effet catalyseur de la solution utilisée et augmenter le risque d'induire des voies de dégradation irréalistes.[36]

Lorsque la solubilité du principe actif impose l'utilisation d'un co-solvant organique, il est nécessaire d'éviter les alcools qui peuvent générer des réactions secondaires (par exemple : trans-estérification dans le cas du méthanol), surtout lorsque la substance contient une fonction acide carboxylique, amide ou ester. En effet, ces fonctions peuvent réagir facilement avec le méthanol. [37]

L'acétonitrile est généralement considéré comme un solvant organique inerte. Il est aprotique et compatible avec la plupart des méthodes d'analyse par HPLC. C'est pour cette raison qu'il est préférable au méthanol dans les études du test de stress hydrolytique. Il existe d'autres solvants qui ont été recommandés dans ces études (**Tableau IV**).

**Tableau IV** : Co-solvants organiques utilisés dans les études de test de stress

pH acide	pH neutre	pH basique
Acétonitrile	Acétonitrile	Acétonitrile
DMSO	NMP	DMSO
Acide acétique		Glyme
Acide propionique		Diglyme
		<i>p</i> -Dioxane

Pour les produits insolubles, il est également possible de réaliser l'étude de dégradation en suspension, dans la mesure où une étape de redilution dans un solvant adapté est prévue pour solubiliser le principe actif avant l'analyse [38].

Si le pH du principe actif mis en solution est loin de la neutralité, il est préférable de rajouter une condition de dégradation en pH tamponné neutre (entre 6 et 8) afin de couvrir la gamme de pH étudiée.

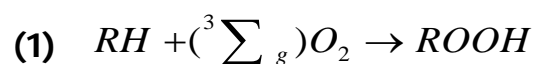
La température peut être modifiée pour atteindre le niveau de dégradation souhaité. Une température maximale de 60°C est conseillée pour les solutions aqueuses.

Après la phase de dégradation du principe actif en milieu acide ou basique, une étape de neutralisation peut être envisagée afin d'arrêter la réaction et d'éviter ainsi une dégradation excessive. Néanmoins, lors de l'interprétation des résultats, il faudra prendre en compte cette phase de neutralisation.

Au cas où des précipités apparaissent au cours du stress, il sera nécessaire de reprendre la solution dans un milieu organique afin d'analyser le précipité. [29]

### **1.3. La dégradation oxydante :**

L'eau et l'oxygène sont les molécules omniprésentes qui affectent souvent la stabilité d'une substance médicamenteuse. Parfois, il semble difficile de reproduire l'auto-oxydation qui se fait par l'oxygène telle qu'elle est formulée par l'équation (1).



Les agents oxydants qui peuvent être utilisés dans le test de stress sont :

#### ***1.3.1. Le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde organique :***

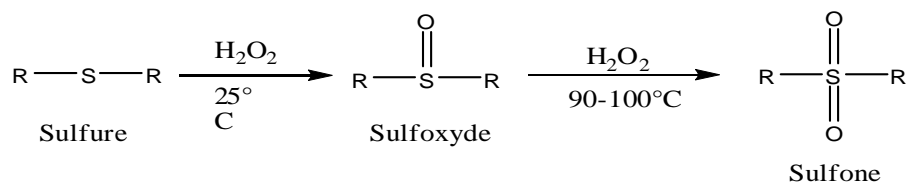
L'oxydation par le peroxyde est très répandue dans le développement pharmaceutique. Les réactions les plus communes des composés organiques sont les attaques électrophiliques de l'amine et des sulfures pour donner des

N-oxydes (Equation 2) et sulfoxydes ou sulfones (Equation 3), respectivement, et une lente attaque de la double liaison carbone-carbone pour donner un époxyde (Equation 4) [39]. Ces réactions sont ioniques et ne fournissent pas des radicaux libres. Ce type d'oxydation donne souvent des impuretés de dégradation qui peuvent être mineures dans la dégradation à long terme. [40]

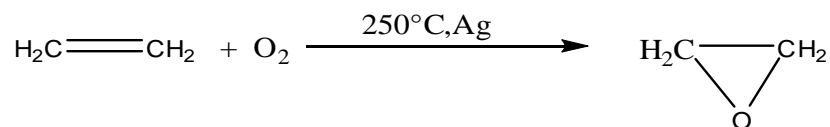
**Equation (2):**



**Equation (3):**



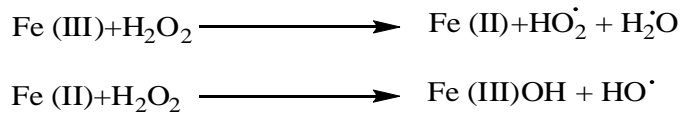
**Equation (4):**



**1.3.2. Les métaux de transition :**

Les métaux de transition sont des catalyseurs auto-oxydants pouvant oxyder un substrat avec un mécanisme radicalaire ou ionique, activer l'hydrogène par complexation, ou décomposer le peroxyde comme dans le cas du réactif de Fenton.

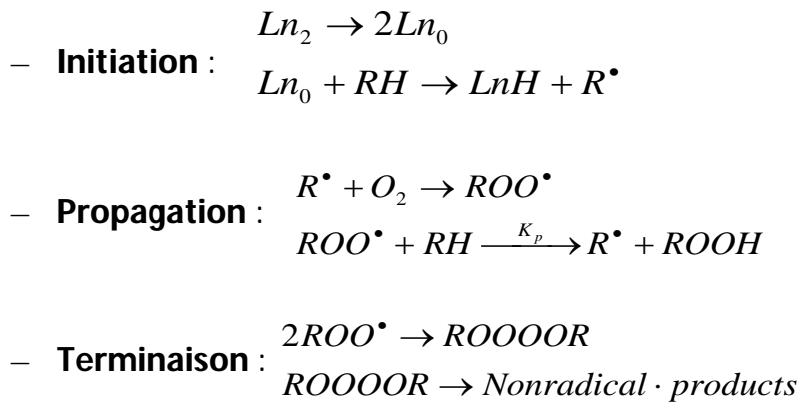
Le réactif de Fenton contient le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde organique qui sont des oxydants, activés par des ions de métaux catalyseurs, composés de mélanges de sel de fer (II) et de sels de peroxyde. Un mécanisme simple de cette réaction est proposé (Equation 5) : le Fe (II) décompose H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans un cycle catalytique.

**Equation (5) :**

Le radical OH produit sous les conditions de Fenton est beaucoup plus réactif que l'oxydant naturel ROO•. Donc, les traces d'ions de métaux lourds en présence de peroxydes peuvent avoir un effet préjudiciable sur les substances sensibles. [41,43]

**1.3.3. Le radical initiateur (exemple : Azo-bis(iso-butyronitrile) (AIBN)) :**

La réaction d'oxydation radicalaire commence par la phase d'initiation impliquant la formation des radicaux, suivie par la phase de propagation et se termine par une phase de terminaison, comme le suivant : [42]



En présence de la chaleur, la réaction d'oxydation est généralement compliquée en particulier lorsque les produits intermédiaires sont instables à des valeurs élevées de température. Dans ce cas, le taux et la voie d'oxydation seront différents de ceux observés à basse température.

Par ailleurs, la vitesse de la réaction d'oxydation par le peroxyde en solution peut actuellement être réduite à température élevée en raison de la diminution de la teneur en O<sub>2</sub> dissous. Ainsi, il convient de noter que la température ambiante est suffisante pour réaliser le test d'oxydation par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La sensibilité des fractions électrophiles à l'oxydation par le peroxyde peut être importante si la réaction avec le peroxyde d'hydrogène est comparée à la véritable stabilité de la substance médicamenteuse exposée au radical initiateur. Par exemple, les amines peuvent réagir quantitativement avec du peroxyde d'hydrogène dans des conditions douces pour donner le N-oxyde, alors qu'ils sont tout à fait stables dans l'oxydation avec le radical et leur N-oxyde est une impureté mineure, parce que le mécanisme est différent dans les deux processus.

Par conséquent, l'accord entre les résultats de l'oxydation avec le radical et l'oxydation par  $H_2O_2$  est souvent une question de hasard. Néanmoins, le test avec  $H_2O_2$  devrait toujours être effectué en parallèle avec l'essai utilisant le radical initiateur car il donne des informations complémentaires. **[43]**

**1.4. La dégradation photolytique :**

La dégradation par la lumière résulte de l'exposition à la lumière UV-visible à des longueurs d'ondes situées entre 300 et 800 nm. Le taux de dégradation dépend directement de la quantité du rayonnement incident et de la quantité du rayonnement absorbée par le composé.

Une variété de sources de lumière a été utilisée, en respectant à la fois la longueur d'onde et l'intensité des lampes germicides (presque monochromatique, 254nm) à la lumière solaire (émission de l'extension de proche-UV à l'IR). D'un point de vue scientifique, tout choix de la source de lumière est correct à condition que la lumière émise soit réellement absorbée.

Les normes ICH (Conférences Internationales d'Harmonisation) décrivent deux options pour les sources de lumière utilisées dans les essais de photostabilité :

– **Option 1** : il s'agit de toutes les sources lumineuses donnant un rendement comparable à celui de l'étalon d'émission (D65/ID65) comme, par exemple, une lampe fluorescente donnant une lumière du jour artificielle combinant la lumière visible et l'ultraviolet (UV), une lampe au xénon ou une lampe aux haloïdes (halogénures métalliques).

Le D65 est l'étalon international de la lumière du jour extérieure défini dans la norme ISO 10977:1993. L'D65 est l'équivalent de la lumière du jour indirecte intérieure.

Si la source lumineuse émet une partie importante du rayonnement au dessous de 320nm (UV B, UV C), il faut les éliminer au moyen d'un filtre approprié.

– **Option 2** : l'échantillon doit être exposé à la fois à une lumière fluorescente blanche et dans l'ultraviolet proche.

Une lampe fluorescente donnant un rendement comparable à celui indiqué dans la norme ISO 10977 (1993) ; et une lampe dans le proche ultraviolet avec distribution spectrale entre 320 nm et 400 nm et une émission d'énergie maximum comprise entre 350 nm et 370 nm.

Du point de vue pratique, il est nécessaire d'utiliser la même lampe dans les deux tests : le test de stress et celui de confirmation. Les ICH décrivent deux types de tests pour la détermination de la photostabilité du médicament : le test de la dégradation forcée et le test de confirmation de la photostabilité.

Conçues par analogie aux études de stabilité accélérée, les épreuves de confirmation servent à déterminer les caractéristiques de photostabilité du produit dans des conditions normalisées. Elles ont pour but de fournir les informations nécessaires pour la manipulation, l'emballage et l'étiquetage.

En effet, elles nous informent sur la nécessité de prendre des précautions particulières dans la fabrication ou dans le choix de la formule, ou d'utiliser un emballage photorésistant et de donner des indications spéciales sur l'étiquette pour réduire le risque d'exposition à la lumière au cas où le médicament est photolabile.

Les études de dégradation forcée, quant à elles, sont conçues pour induire la formation de tous les produits de photo-dégradation qui ont une chance raisonnable d'être formés au cours du test de confirmation. S'il est démontré que les produits de dégradation ne sont pas formés sous les conditions de l'épreuve de confirmation, ces produits ne seront pas examinés par la dégradation forcée par la suite.

Ces études ne sont pas conçues pour établir la relation entre les taux de photo-dégradation et le stockage. Par conséquent, la dose de la lumière utilisée dans le test de confirmation n'est pas suffisante pour le test de stress. C'est pour cette raison que les ICH recommandent pour les études de dégradation forcée une exposition 5 à 10 fois supérieure à celle utilisée dans les études de confirmation.

En ce qui concerne les études de confirmation, les échantillons doivent être exposés à la lumière visible fournissant un éclairage supérieur à 1,2 millions de lux et une heure de l'ultraviolet proche dont l'énergie est d'au moins 200W.h/m<sup>2</sup>.

Au cas où on obtient des produits de dégradation au cours du test de confirmation, ils doivent être examinés même s'ils existent à une faible quantité.

La mesure de la dose de la lumière est particulièrement importante dans les études de dégradation forcée. Le flux de la lumière peut être mesuré au moyen d'un produit chimique : actinomètre, c'est-à-dire, à l'aide d'une substance dont le rendement quantique de photo réaction est connu, ou par le biais d'un instrument physique (phototube ou un photomultiplicateur).

Le choix d'un actinomètre chimique convenable dépend de sa sensibilité et de la longueur d'onde de la lumière absorbée. Il faut toutefois étalonner le système actinométrique avec la source lumineuse utilisée. Les ICH proposent la photodégradation de 2% de quinine monochlorhydrate dihydrate dans l'eau (poids/volume) en tant qu'actinomètre de la lumière UV (300-380nm). Quelques exemples sont donnés dans l'annexe 1. [44]

### **1.5. Les conditions opératoires**

Les conditions opératoires proposées par *D. Breton et ses collaborateurs* [30], dans un article de STP Pharma, pour la dégradation des principes actifs sont résumées dans les tableaux suivants (**Tableau V** et **Tableau VI**).

**Tableau V** : Conditions opératoires proposées pour l'étude de dégradation du principe actif

Stress	Etat du PA	Conditions types	Conditionnement	Condition maximale de stress
Chaleur	Tel quel	-Minimum : 10°C au dessus de la condition accélérée ICH. -Maximum : 20 à 30°C au dessous de la température de fusion ou de la transition cristalline. -Abri de la lumière.	Contenant verre hermétiquement fermé	12 jours 80°C
Chaleur + Humidité	Tel quel	-Au minimum 75% d'HR -Température conditions retenues pour le stress chaleur -Abri lumière	Contenant verre ouvert	12 jours 80°C 95% d'HR
Photo-dégradation	Tel quel	1.2 million Lux.h et pas moins de 200 watt.h/m <sup>2</sup>	Contenant inerte et transparent aux UV	–
Influence du pH	Solution aqueuse ou si nécessaire hydro-organique	-pH basique : NaOH 0.1 à 1M -PH acide : HCl 0.1 à 1M -Température ambiante -Abri lumière	Contenant étanche et inerte	10 jours molarité 1M T <sub>max</sub> 60°C
Stress oxydant	Solution aqueuse ou si nécessaire hydro-organique	-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : 0.1 à 10% ou autre agent oxydant -Température ambiante -Abri lumière	Contenant étanche et inerte	24h pour concentration 10%

**Tableau VI :** Conditions opératoires proposées pour l'étude de dégradation du produit fini

<b>Stress</b>	<b>Forme pharmaceutique</b>	<b>Conditions</b>	<b>Conditionnement</b>	<b>Condition maximale de stress</b>
Chaleur	Solide	- Au minimum 10°C au dessus de la condition accélérée ICH - Abri lumière	Contenant fermé	4 semaines à 60°C (ou 12 jours 80°C)
	Liquide et semi solide		Conditionnement primaire et/ou contenant inerte fermé	4 semaines à 60°C (ou 12 jours 80°C)
Chaleur + Humidité	Solide	- Au minimum 75% HR température : conditions retenues pour le stress chaleur - -Abri lumière	Contenant ouvert	4 semaines à 60°C (ou 12 jours 80°C)  Haut niveau d'humidité
Photo-dégradation	Solide	Décrites dans ICH Q1B	Contenant inerte transparent aux UV	1.2 million de lux.h et pas moins de 200 Watt.h/m <sup>2</sup>
	Liquide et semi solide			

## **2. Le taux de dégradation**

Le taux apparent de dégradation définit la stabilité intrinsèque du médicament. En effet, il peut être utile dans la conception et la formulation d'un médicament beaucoup plus stable. Par exemple : certains composés font preuve d'instabilité sous des conditions basiques, engendrée par des excipients, qui peuvent causer un micro-environnement alcalin dans la formulation. Ces données incitent à éviter l'utilisation de ces excipients ou de le faire avec précaution, ce qui permet de maximiser la stabilité afin de parvenir à une durée de vie acceptable.

La cinétique de la dégradation obtenue à partir des valeurs du taux de dégradation de chaque exposition à la même condition de stress, révèle l'ordre de la réaction. Et en se référant aux voies de décomposition, il sera simple de différencier les produits de dégradation primaires de celle qui sont secondaires [41].

Le calcul du taux de dégradation se fait selon l'équation suivante :

$$\frac{A - B}{A} \times 100$$

A : Aire du principe actif dans l'échantillon non dégradé.

B : Aire du principe actif dans l'échantillon dégradé.

A condition que la concentration théorique injectée (dégradé et non dégradé) est la même et que la concentration est totale dans chaque milieu de solubilisation utilisé. Le taux de dégradation ne doit pas dépasser les 30%.

### **3. Les voies de dégradation d'une substance et les structures de ses produits de dégradation**

La connaissance de la structure des produits de dégradation majeurs d'un composé est une condition préalable pour comprendre les voies de dégradation, ce qui est important pour l'évaluation des sites de la molécule qui sont sensibles à cette décomposition sous les différentes conditions.

Une telle information est essentielle pour déterminer les caractéristiques de stabilité intrinsèque de la substance médicamenteuse et pour concevoir une stratégie appropriée de contrôle de dégradation. Autrement dit, ces données sont intéressantes afin de développer une formulation stable, de créer une méthodologie analytique convenable, et d'exiger des conditions d'emballage et de stockage appropriées. [45,46]

L'étape critique de l'étude de la dégradation forcée est de trouver les produits de dégradations majeurs, puis de les identifier par HPLC couplée à la spectrométrie de masse et la RMN [31].

#### **IV. Etapes de la dégradation forcée**

##### **1. La collecte des données**

Toute étude de dégradation forcée commence par la collecte de toutes les informations chimiques concernant le composé en question : structure moléculaire, solubilité, instabilité chimique, hygroscopicité, pureté énantiomérique ...

La structure chimique permet de déduire si le composé est détectable par le détecteur UV, révèle la présence ou l'absence de groupements fonctionnels ionisables et la réactivité de la molécule. Elle indique également si la molécule présente des centres chiraux. Dans ce cas, la détermination de la stabilité chirale peut être nécessaire.

La solubilité des composés, particulièrement la solubilité aqueuse, est très importante dans les études du test de stress. Au cas où le composé est peu soluble dans l'eau, il faut rajouter un co-solvant organique pour le solubiliser.

## 2. Les essais préliminaires

Il est nécessaire de réaliser une étude préliminaire pour obtenir des informations de base sur la stabilité du composé.

Les échantillons utilisés dans cette étude préliminaire peuvent être utilisés pour le développement des méthodes d'analyse. Le test de stress vise à générer 5 à 30% de dégradation sous n'importe quelles conditions de stress.

Le **Tableau VII** présente les conditions de stress typiques pour la réalisation des études préliminaires :

**Tableau VII** : Conditions typiques de stress pour les études préliminaires

Echantillon / Conditions	Temps d'exposition
Solide / 70°C	1 semaine
Solide /70°C/75% HR	1 semaine
Solide / lumière	2-3 × exposition ICH
Solution aqueuse/ lumière	2-3 × exposition ICH
Solution HCl 0,1N / jusqu'à 70°C	1 à 7 jours
Solution aqueuse / jusqu'à 70°C	1 à 7 jours
Solution pH 8 / jusqu'à 70°C	1 à 7 jours
Solution NaOH 0,1N / jusqu'à 70°C	1 à 7 jours
Solution H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,3% / en absence de lumière	1 à 7 jours
Solution avec radical initiateur / 40°C	1 à 7 jours

### 3. Screening du test de stress

Du fait de la variabilité significative de la stabilité des médicaments, il est impossible de trouver des conditions de stress universelles. C'est pour cette raison qu'il faut réaliser un screening d'un test de stress adapté à la substance en cause.

Il est important de proposer les limites supérieures pour les différentes conditions de stress comme point de départ de cette étude.

Au cas où aucune dégradation n'était induite par les conditions de stress maximales, la molécule est considérée stable. Dans le **Tableau VIII** et le Tableau IX, on retrouve les conditions de stress maximales pour les échantillons à l'état solide et en solution. [29]

**Tableau VIII** : Conditions de stress maximales proposées pour les substances actives à l'état solide

Conditions de stockage	Temps d'exposition
70°C	4 à 6 semaines
70°C NaCl 75% HR	28 jours
Stress par la lumière (Photostress)	2-5 × temps d'exposition définis dans Q1B ICH : Tests de photostabilité des nouvelles substances actives et produits finis.

**Tableau IX :** Conditions de stress maximales proposées pour les substances actives sous forme de solutions ou de suspensions

<b>Solution ou suspension</b>	<b>Conditions de stress</b>	<b>Temps d'exposition</b>
HCl 0,1N, Eau, NaOH et tampon de pH compris entre 1 et 14	70°C	14 jours
Acétonitrile/Eau (80 :20) contenant un radical initiateur comme AIBN	40°C	7 jours
Eau (tampons avec groupements ionisables)	Photostress	2-3 × temps d'exposition définis dans Q1B ICH : Tests de photostabilité des nouvelles substances actives et produits finis.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> diluée (0,3 à 3%)	25°C	7 jours
Solutions contenant le sel de métal dilué (Fe(III), Cu(III))	40°C	1 jour

En tenant compte des informations obtenues à partir de l'étude préliminaire, il est simple de concevoir un test de stress dont les conditions seront optimales.

#### **4. Préparation des échantillons**

##### **4.1. Blanc**

Il représente le solvant dans lequel la substance médicamenteuse ou le produit fini est solubilisé. Le blanc sert à différencier entre les impuretés qui y sont présentes et celles natives du produit concerné.

##### **4.2. Standards**

Les essais du test de stress requièrent l'utilisation de quelques standards externes servant comme référence de l'étude. Par ailleurs, une fois préparés, les standards doivent être stockés dans des conditions qui ne favorisent pas la dégradation.

Au moment de l'analyse, les échantillons et le standard non dégradé seront traités successivement.

##### **4.3. Echantillon en solution**

Il faut préparer la solution mère de concentration connue à partir de laquelle on prélève des échantillons pour chaque essai du test de stress. Cette méthode permet d'éviter les erreurs résultant de la pesée, de minimiser la marge de l'incertitude et d'éviter le problème de la solubilité.

Toutefois, elle exige que le récipient contenant la solution soit bien fermé pour empêcher l'évaporation. [29]

## **V. La notion «Masse balance»**

D'un point de vue théorique, une véritable diminution de la masse de la molécule mère dans les études de la dégradation forcée est nécessairement équivalente à la masse totale de tous les produits de dégradation formés.

Toutefois, ce n'est presque jamais le cas. L'exigence d'un système fermé est rarement atteinte. En effet, la dégradation peut produire des substances volatiles qui s'échappent de la matrice, des produits qui s'adsorbent, ou d'autres pertes physiques qui peuvent survenir en empêchant une évaluation exacte des quantités de produits dégradés. De ce fait, la notion « masse-balance » fut introduite dans le domaine pharmaceutique.

La notion « masse-balance » permet d'apprécier la sécurité du médicament par le biais de ses produits de dégradation. Si on observe, par exemple, une perte de 20% de la molécule mère et la formation que de 5% de produits de dégradation, il est probable que d'autres produits de dégradation soient formés mais qui ne sont pas précisément déterminés par la méthode donnée. Parce que les produits de dégradation inconnus pourraient être toxiques ou compromettre la sécurité du médicament, il est important de disposer de méthodes qui permettent de détecter tous les principaux produits de dégradation (produits de dégradation primaires).

Par ailleurs, la notion « masse-balance » est essentielle pour démontrer que la méthode d'analyse utilisée est indicative de la stabilité du produit et pour la valider. En plus, elle permet aussi de prévoir une éventuelle voie de dégradation alternative. [47]

La « masse-balance » peut être calculée et exprimée de deux façons :

- **« Masse-balance » absolue : AMBD** (*défaut Absolu de la Masse Balance*)

Il s'agit de la différence entre la quantité du produit consommé et celle des impuretés formées exprimée en unité de masse.

$$AMBD = (M_{p0} - M_{px}) - (M_{i0} - M_{ix})$$

- $M_{p0}$  : la masse de la molécule mère non dégradée à  $t_0$
- $M_{px}$  : la masse de la molécule mère non dégradée à  $t_x$
- $M_{i0}$  : la somme des masses des impuretés à  $t_0$
- $M_{ix}$  : la somme des masses des impuretés générées par la dégradation à  $t_x$

- **« Masse-Balance » relative : RMBD** (*défaut Relatif de la Masse Balance*)

Exprimée en pourcentage [29]

$$AMBD = \frac{(M_{p0} - M_{px}) - (M_{i0} - M_{ix})}{M_{p0} - M_{px}} \times 100$$

## ***Chapitre 3 : Développement de la méthode d'analyse***

---

La stratégie de développement d'une méthode indicatrice de la stabilité commence par un "screening" d'une méthode capable de séparer et de détecter un large éventail des produits de dégradation. Toutefois, il est impossible de développer une méthode indicative de la stabilité d'un nouveau médicament d'une manière idéale dès le début. Dans ce cas, la réalisation du test de stress est beaucoup plus importante surtout lorsque les produits de dégradation potentiels sont inconnus.

Dans la pratique pharmaceutique actuelle, la méthode analytique la plus utilisée est la méthode HPLC liée à un détecteur à la barrette de photodiode (DAD). Cette méthode d'analyse chromatographique est régie principalement par deux paramètres : les caractéristiques de la colonne disponible pour l'étude (contenant la phase stationnaire) et les proportions du mode gradient utilisées de la phase mobile. [48]

Il est préférable d'utiliser un large gradient d'élution pour couvrir un large éventail de polarité, surtout lorsque les produits de dégradation sont inconnus. Cela augmente les chances de l'élution des produits de dégradation plus polaires loin du front de solvant. Souvent, l'utilisation de plusieurs étapes dans le mode gradient est bénéfique : le premier segment commence avec une faible concentration de la phase organique, qui augmente rapidement dans le second segment, où l'élution se fait sous un mode isocratique (ou avec une très faible pente) pour maximiser la résolution entre le principe actif et les produits

de dégradation. Le troisième segment de la pente commence après l'élution du principe actif et il se caractérise par une concentration élevée de la phase organique pour pouvoir éluer les produits de dégradation moins polaires.

Pour développer une méthode indicative de stabilité d'un composé et optimiser la séparation des différents pics, il est nécessaire de choisir des échantillons appropriés à ce processus soit en préparant des échantillons partiellement dégradés ou en utilisant des échantillons dopés avec des impuretés de la substance concernée. De toute façon, la meilleure manière de développer une méthode spécifique à la substance médicamenteuse et ses impuretés consiste à utiliser ces deux méthodes à la fois.

Les informations recueillies à partir du test de stress de la substance médicamenteuse sont utilisées comme guide dans la formulation du produit fini. La compatibilité principe actif -excipient peut être étudiée pour déterminer la présence ou l'absence d'interactions significatives entre les excipients et le principe actif. Une fois la méthode d'analyse est développée, les études du test de stress peuvent être effectuées sur la formulation, et les résultats obtenus seront comparés à ceux de la substance médicamenteuse seule (voir **Annexe IV**). [29]

---

# PARTIE PRATIQUE

---

Introduction

Matériel et Méthodes

Résultats

Discussion

Conclusion

# ***Introduction***

---

Aucune étude du développement d'une méthode d'analyse indicative de la stabilité du Docetaxel n'a été menée au Maroc par les autorités et les organismes de contrôle de la qualité du médicament. C'est dans cette optique que le présent travail s'inscrit.

Le présent travail a été effectué au sein de la division du Laboratoire National de Contrôle de Médicaments de la Direction du Médicament et de la Pharmacie de Rabat.

Il consiste à développer une méthode d'analyse indicative de la stabilité du Docetaxel. Cette étude était impossible dans la mesure où le système de conformité du Docetaxel n'était pas fourni par le laboratoire fabricant. C'est pour cette raison que nous avons procédé à générer les substances apparentées du Docetaxel par le processus de la dégradation forcée.

Le développement de La méthode d'analyse de Docetaxel, sera suivi d'une étude préliminaire de la validation, permettant de prévoir la validité de cette méthode à l'usage auquel elle est destinée.

# ***Matériel et méthodes***

---

## **I. Matériel**

### **1. Matière première et produit fini**

Le Docetaxel a été fourni par le laboratoire Aventis :

- Echantillon de la matière première : lot n° 0800072876.
- étalon de travail (standard) : lot n° 6057 SS.

Le produit fini du Docetaxel a été fourni par un laboratoire pharmaceutique marocain.

### **2. Réactifs**

- Acide chlorhydrique HCl : 0,1N, 0,5N et 1N.
- Hydroxyde de sodium NaOH : 0,1N, 0,5N et 1N.
- Peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 3%.
- Polysorbate 80, Tween® 80: lot N° 31480, de concentration 1.08Kg/l.
- Acétonitrile grade HPLC (phase mobile).
- Eau distillée et filtrée pour HPLC (phase mobile).
- Ethanol absolu.

### **3. Appareillage**

#### **3.1. HPLC en phase inverse (RP-HPLC) :**

L'analyse chromatographique HPLC est réalisée sur un appareil type Perkin Elmer Série 200 lié à un détecteur à la barrette de photodiode Série 200, et waters e 2695 lié à un détecteur à la barrette de photodiode type waters 2998.

#### **3.2. Système de filtration :**

Il s'agit d'une pompe à vide de type WELCH VACUUM TECHNOLOGIE.

#### **3.3. Lampe UV/Visible :**

Il s'agit d'une VILBER LOURMAT, cette lampe émet des rayonnements UV de longueur d'onde 365nm et 254nm et dans le visible entre 400nm et 800nm.

#### **3.4. Etuve :**

L'étuve est de type WTC BINDER.

#### **3.5. pH-mètre :**

Le pH-mètre contient une électrode à pH combinée ; Il est de type SCHOTT INSTRUMENT.

## **II. Méthodes**

### **1. Collecte des données**

- Nous avons procédé à l'analyse visuelle de la structure développée du Docetaxel, pour déduire son éventuelle pureté énantiomérique.
- Les données de la solubilité ont été recueillies à partir des résultats des études de solubilité réalisées sur Docetaxel dans cette étude.
- Le pH du Docetaxel est mesuré par un pH-mètre.
- Hygroscopicité du Docetaxel : nous l'avons déduit lors de la manipulation du Docetaxel.

### **2. Méthodologie générale de travail**

- La préparation de la solution de dilution du Docetaxel, selon la monographie de la Pharmeuropa: [9]  
Acide acétique/acétonitrile /eau distillée (0,05 : 50 : 50) (V/V/V).
- La préparation de la phase mobile : nous utilisons un mélange de l'acétonitrile et de l'eau distillée et filtrée, à des proportions qui changent selon le mode gradient de la méthode d'analyse utilisée.
- La préparation des échantillons destinés à être analysés.
- L'analyse chromatographique du Docetaxel nécessite le développement d'une méthode indicative de la stabilité de cette molécule.

### **3. Dégradation forcée du Docetaxel**

D'abord, nous avons préparé des échantillons non dégradés qui vont servir au calcul du taux de dégradation des essais préliminaires et du test de stress proprement dit, ensuite nous réalisons des essais préliminaires pour obtenir des informations sur la stabilité du composé, et en tenant compte de ces derniers, il sera simple de concevoir un test de stress dont les conditions seront optimales, et auxquelles seront soumises la matière première et le produit fini.

#### **3.1. Préparation des échantillons non dégradés du Docetaxel**

- Blanc : Mélange de solvants (acide acétique 0.05/ acetonitrile 50/ eau 50) à laquelle nous avons ajouté quelques gouttes d'éthanol.
- Standard (étalon de travail) : 20mg de la substance chimique de référence est solubilisée dans 1,5ml d'éthanol et ajustée à un volume de 20ml par le mélange de solvants.
- La solution mère de la matière première : Constituée de 50mg de Docetaxel solubilisé dans 2,5ml d'éthanol et ajusté à un volume de 50ml par le mélange de solvants.
- La solution mère du produit fini : La solution de pré-mélange contient 10 mg/ml de Docetaxel. La reconstitution de la solution consiste à mélanger le solvant (alcool) avec la solution à diluer (Le Docetaxel +

les excipients). La solution préparée est diluée avec le mélange de solvants pour atteindre une concentration de 4g/l puis de 1g/l.

- Placebo 1g/l : préparé à partir du tween 80<sup>®</sup> 1.08Kg /l, nous réalisons une dilution de 1/1000.

Les échantillons préparés sont tous de la même concentration 1g/l, ce qui permettra de comparer les aires sous les pics des différents échantillons dégradés et non dégradés.

### **3.2. Essais préliminaires sur la matière première du Docetaxel**

L'étude préliminaire vise à répéter la préparation des essais exposés à chaque condition de stress, jusqu'à atteindre un taux de dégradation entre 5 à 30%.

Les essais préliminaires sont réalisés sur des prélèvements à partir de la solution mère. Ils ont concerné l'exposition de l'échantillon à différentes conditions de stress à savoir :

- *Dégradation hydrolytique dans un milieu acide :*  
Différentes solutions acides de HCl 1N, 0,5N, 0,1N, utilisées à différents volumes ont été testées.
- *Dégradation hydrolytique dans un milieu basique :*  
Différentes solutions basiques de NaOH 1N, 0.1N, 0.01N, 0.05N ont été utilisées.

- *Dégradation oxydative par le peroxyde d'hydrogène :*  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% a été utilisé à différents volumes
- *Dégradation thermolytique :*  
Notre échantillon a été mis dans une étuve à 70°C de 6h à 10h.
- *Dégradation photolytique :*  
Notre échantillon a été soumis aux rayonnements de la lampe UV-Visible pendant 6h à 19h.

### **3.3. Etude de la dégradation forcée du Docetaxel (matière première)**

L'étude de la dégradation forcée du Docetaxel (MP) est conduite à la base des résultats des essais préliminaires. Ces essais permettent de déterminer les conditions de stress optimales qui engendrent un taux de dégradation entre 5 et 30%.

Le blanc a subi également les mêmes conditions de stress que le Docetaxel pour éliminer un éventuel pic dû à la dégradation ou à la contamination du solvant constituant le blanc.

### **3.4. Etude de la dégradation forcée du Docetaxel (produit fini)**

Les conditions de stress optimales subies par le Docetaxel, en tant que matière première, seront celles retenues pour l'étude de la dégradation forcée du produit fini et de son placebo.

#### **4. Méthode d'analyse chromatographique du Docetaxel**

Jusqu'à aujourd'hui, le Docetaxel n'est inscrit dans aucune Pharmacopée. Toutefois, il existe un projet de la nouvelle édition de la pharmacopée européenne (Pharmeuropa) qui décrit une méthode de contrôle du Docetaxel. Cette dernière n'était pas adéquate à l'étude de la dégradation forcée, c'est pour cette raison que nous avons procédé au développement d'une méthode d'analyse du Docetaxel, qui sera pré-validé par la suite.

##### **4.1. Développement de la méthode d'analyse du Docetaxel**

Pour développer une méthode indicative de la stabilité de Docetaxel, nous commençons par un "screening" d'une méthode adéquate.

En premier lieu, nous avons utilisé la méthode décrite dans la Pharmeuropa [9], qui a donné des résultats inexploitable, ensuite nous avons découvert la deuxième méthode en changeant la nature de la phase stationnaire, les proportions de la phase mobile, et en optimisant d'autres paramètres comme la température, et le temps d'acquisition. Cette méthode n'était pas performante non plus, et enfin, plusieurs modifications de ses paramètres préalablement cités ont menées à la troisième méthode d'analyse, qui reste à pré-valider par la suite.

Les échantillons préparés pour la réalisation des études préliminaires ont été analysés avec la première méthode chromatographique. Ensuite, nous avons utilisé la deuxième méthode pour effectuer quelques essais du test de stress sur la matière première. Enfin, nous avons adopté la troisième méthode chromatographique pour réaliser tous les essais de la matière première et du produit fini d'une manière objective. Ces trois méthodes sont citées ci-dessous:

**4.2. Première méthode analytique :**

La première méthode chromatographique utilisée est extraite de la monographie en vigueur de Pharmeuropa de Docetaxel. La séparation chromatographique est effectuée sur une colonne Xterra (250x 4.6mm) dont la taille des particules est de 3,5µm. La colonne est maintenue à une température de 45°C.

- La phase mobile est constituée d'un mélange d'eau filtrée et d'acétonitrile grade HPLC.
- Le mode d'élution est un gradient :

Temps (min)	Acétonitrile %	Eau %
0-9	28	72
9 → 39	28 → 72	72 → 28

- Le volume d'injection est de 10 µl
- Le débit de la phase mobile est de 1.2 ml/min

- La détection est réalisée à une longueur d'onde de 232 nm en utilisant un détecteur à barrette de diodes.

**4.3. Deuxième méthode analytique :**

Nous avons utilisé pour cette méthode d'analyse des conditions chromatographiques suivantes :

- La séparation chromatographique est effectuée par une colonne SYMMETRY C18 (250 x 4.6mm) dont le diamètre des particules est de 5µm. La colonne est maintenue à une température de 35°C.
- La phase mobile est constituée d'un mélange d'eau et d'acétonitrile
- Le mode d'élution est un gradient :

Temps (min)	Acétonitrile %	Eau %
0-5	30	70
5 → 45	30 → 70	70 → 30

- Le volume d'injection est de 10 µl
- Le débit de la phase mobile est de 1.5 ml/min
- La détection est réalisée à une longueur d'onde de 232 nm en utilisant un détecteur à barrette de diodes.

**4.4. Troisième méthode analytique :**

Nous avons utilisé pour cette méthode d'analyse les conditions chromatographiques suivantes :

- La séparation chromatographique est effectuée par une colonne BDS hypersil C18 (250 x 4.6mm) dont le diamètre des particules est de 5µm. La colonne est maintenue à une température de 35°C.
- La phase mobile est constituée d'un mélange d'eau et d'acétonitrile.
- Le mode d'élution est un gradient :

Temps (min)	Acétonitrile %	Eau %
0-5	27	73
5→ 45	27 → 67	73 → 33

Nous avons gardé le même volume d'injection, le même débit. La détection est réalisée également à une longueur d'onde de 232nm.

#### **4.5. Pré-validation de la méthode d'analyse**

Nous avons procédé à l'évaluation de quelques paramètres de base de la validation, en vue de prévoir la faisabilité d'une éventuelle validation en perspective :

#### **4.6. La spécificité**

La spécificité de la méthode est démontrée en exploitant les résultats des préparations suivantes :

- Préparation du blanc.
- Préparation du standard.

- Préparation d'un essai non dégradé de la matière première.
- Préparation d'un échantillon rassemblant un mélange des essais dégradés par la lumière la chaleur et la base volume à volume.

La préparation de ces échantillons a été détaillée précédemment.

#### **4.7. La linéarité**

Nous réalisons d'une dilution de 2/100 à partir de l'essai du produit fini de 1g/l, qui sera considérée comme le 2% de notre échantillon, ensuite à partir de cette solution nous préparons une solution de :

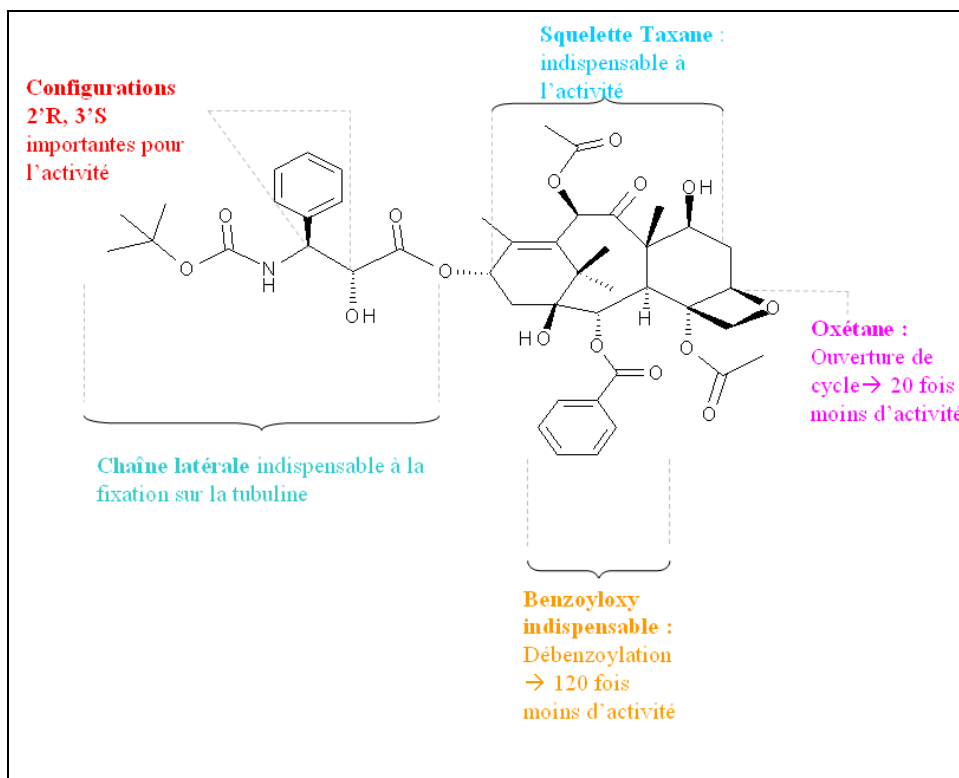
- 1.5% en faisant une dilution à 75%.
- 1% en faisant une dilution à 50%.
- 0.75% en faisant une dilution à 37.5%.
- 0.5% en faisant une dilution à 25%.
- 0.05% en faisant une dilution à 2.5%.

Dans cet essai nous avons effectué une prévalidation de la linéarité à faible concentration c'est à dire que la solution considérée comme le 100% de l'échantillon de 0.01g/l, représente le 1% de la concentration de routine (1g/l)

# ***Résultats***

---

## I. Données expérimentales



**Figure 3 :** Structure développée du Docetaxel

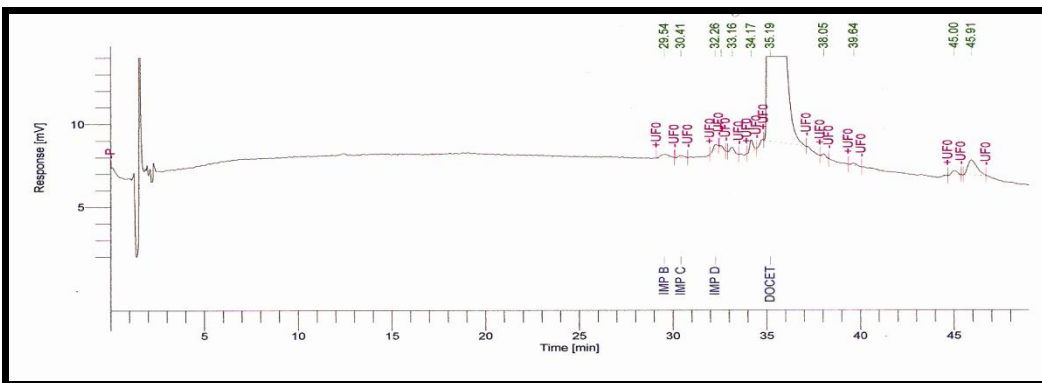
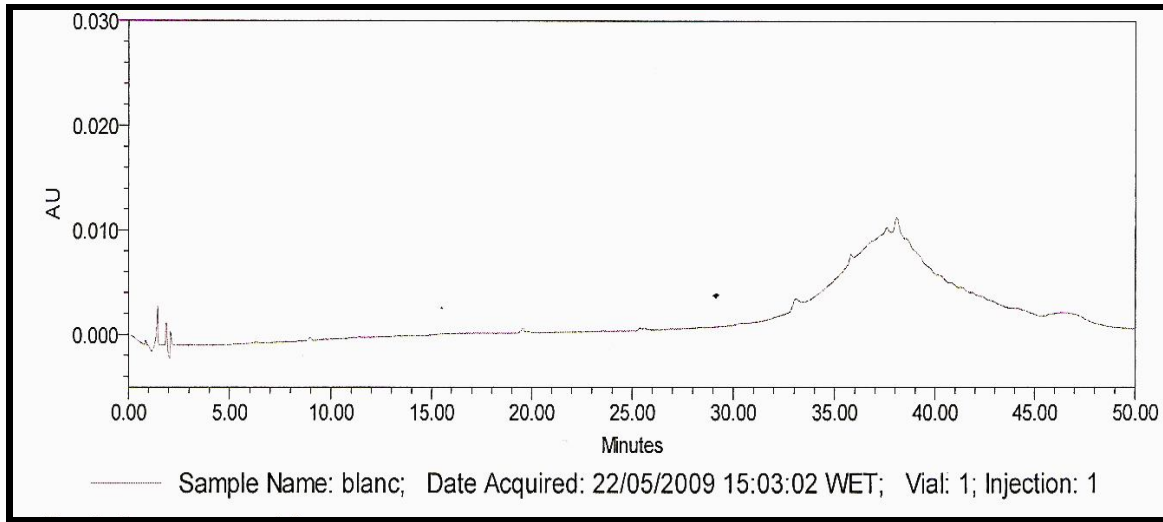
- La pureté énantiomérique : l'analyse visuelle de la structure développée du Docetaxel nous permet de dire que c'est une molécule chirale puisqu'elle présente 11 carbones asymétriques. De ce fait, elle contient plusieurs diastérisomères.
- pH mesuré de Docetaxel est de 3.

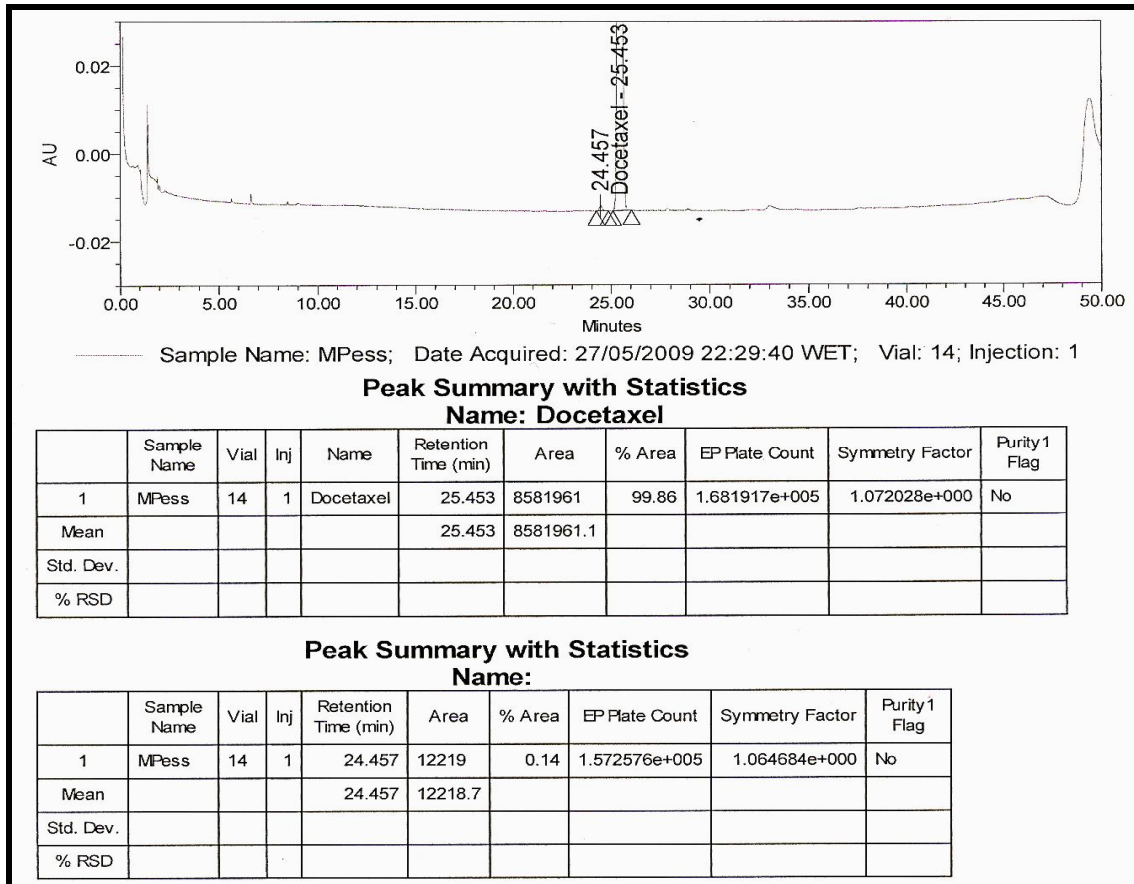
- La solubilité : On remarque que le Docetaxel est pratiquement insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol et soluble dans le chlorure de méthylène.
- Hygroscopicité : Lors de la préparation des échantillons, nous avons remarqué que le Docetaxel (MP) est très hygroscopique.

## **II. Résultats de la dégradation forcée**

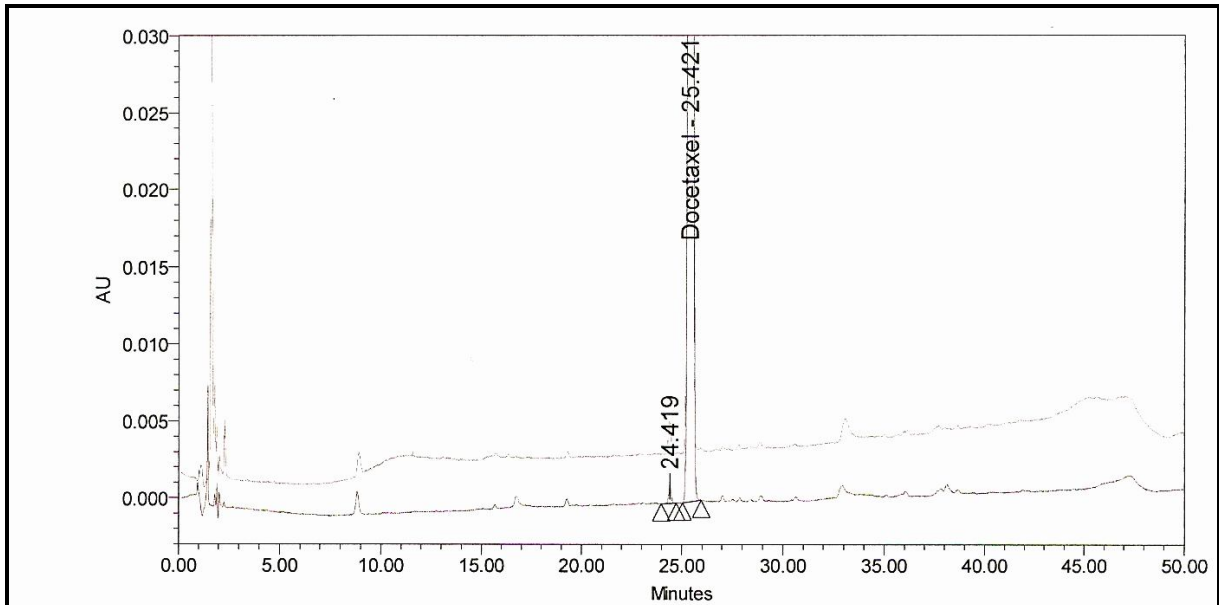
### **1. Résultats de l'analyse chromatographique des échantillons non dégradés**

Les chromatogrammes du blanc, du standard, de l'essai de la matière première et du produit fini, puis du placebo sont présentés ci-dessous :





**Chromatogramme 3 :** Résultats de l'analyse de l'essai non dégradé de la matière première par la troisième méthode chromatographique



— Sample Name: std; Date Acquired: 23/05/2009 04:37:55 WET; Vial: 2; Injection: 4  
 — Sample Name: STD; Date Acquired: 27/05/2009 12:28:21 WET; Vial: 2; Injection: 1

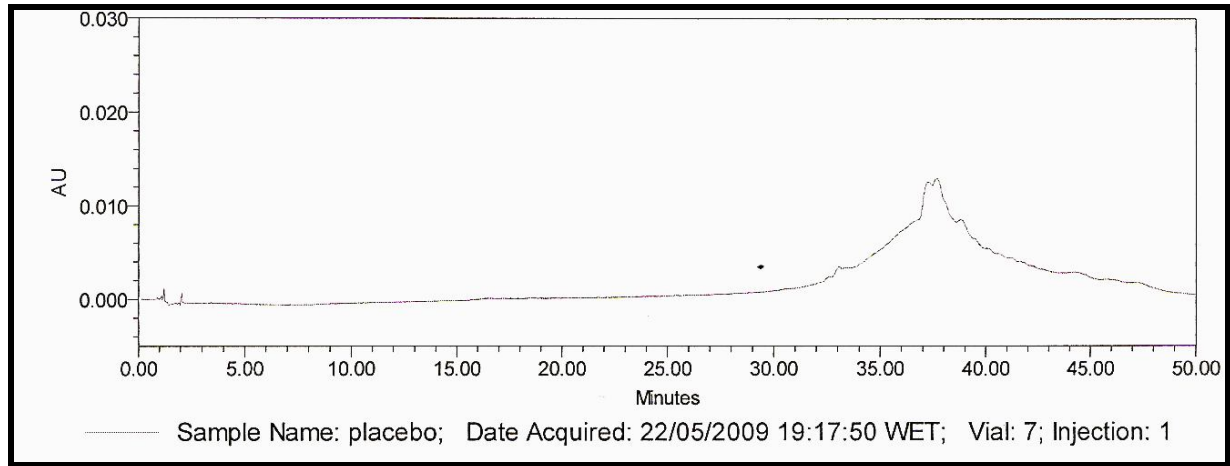
**Peak Summary with Statistics**  
**Name: Docetaxel**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Purity1 Flag
1	std	2	4	Docetaxel	25.421	8611809	99.88	1.815161e+005	1.034279e+000	No
2	STD	2	1	Docetaxel	25.405	8607780	100.00	1.715788e+005	1.011950e+000	No
Mean					25.413	8609794.6				
Std. Dev.					0.012	2849.0				
% RSD					0.05	0.0				

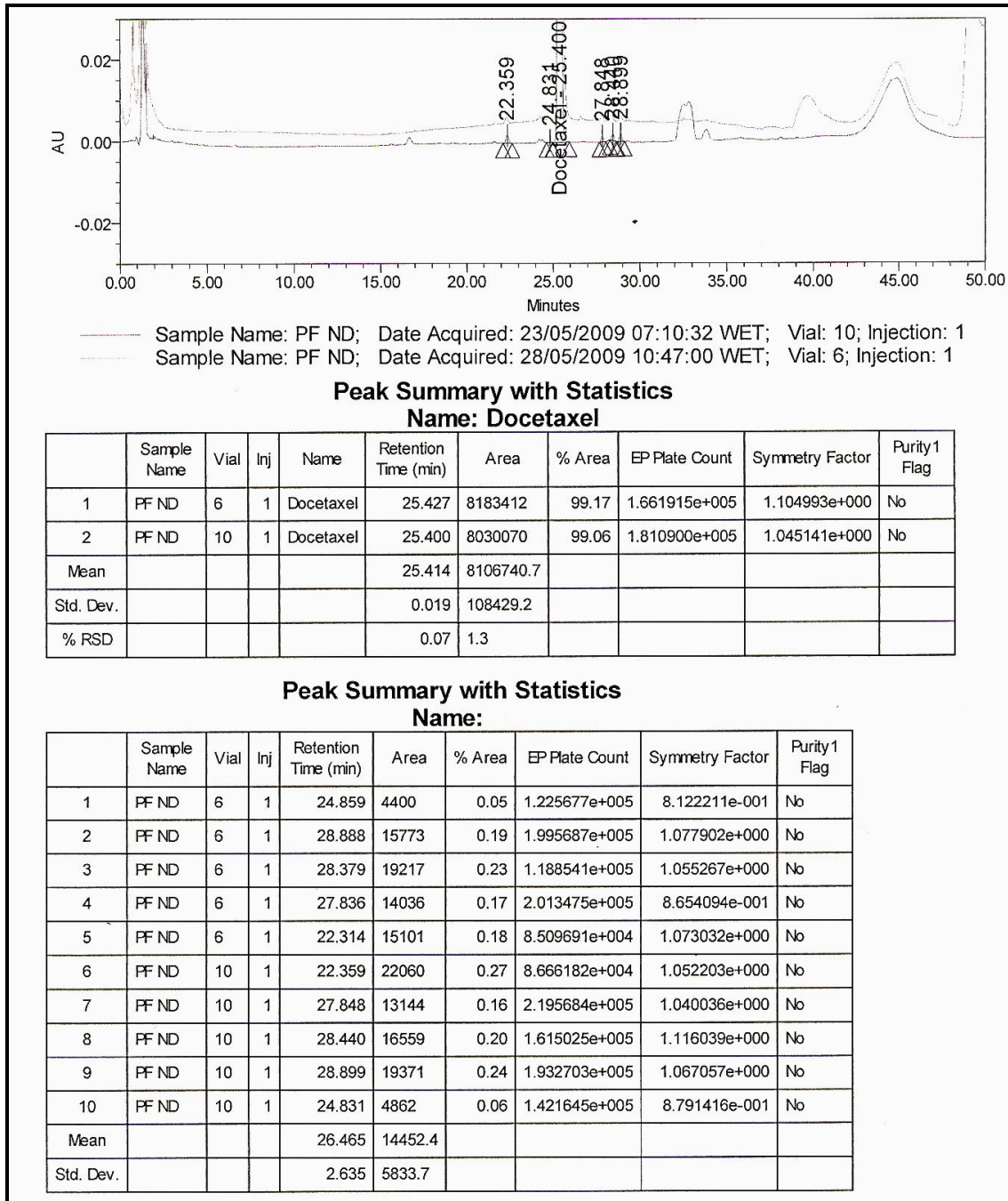
**Peak Summary with Statistics**  
**Name:**

	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Purity1 Flag
1	std	2	4	24.419	10000	0.12	1.784275e+005	1.008142e+000	No
Mean				24.419	9999.6				
Std. Dev.									
% RSD									

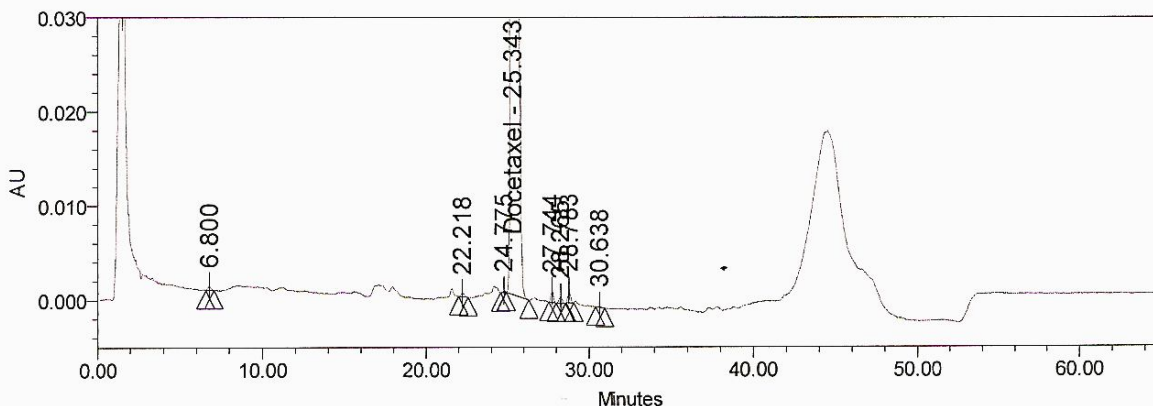
**Chromatogramme 4** : Résultats de l'analyse du standard (1g/L) par la troisième méthode chromatographique



**Chromatogramme 5** : Résultats de l'analyse chromatographique du placebo par la troisième méthode chromatographique



**Chromatogramme 6** : Résultats de l'analyse des essais non dégradés du produit fini par la troisième méthode chromatographique



Sample Name: PF ND; Date Acquired: 09/06/2009 00:11:58 WET; Vial: 11; Injection: 1

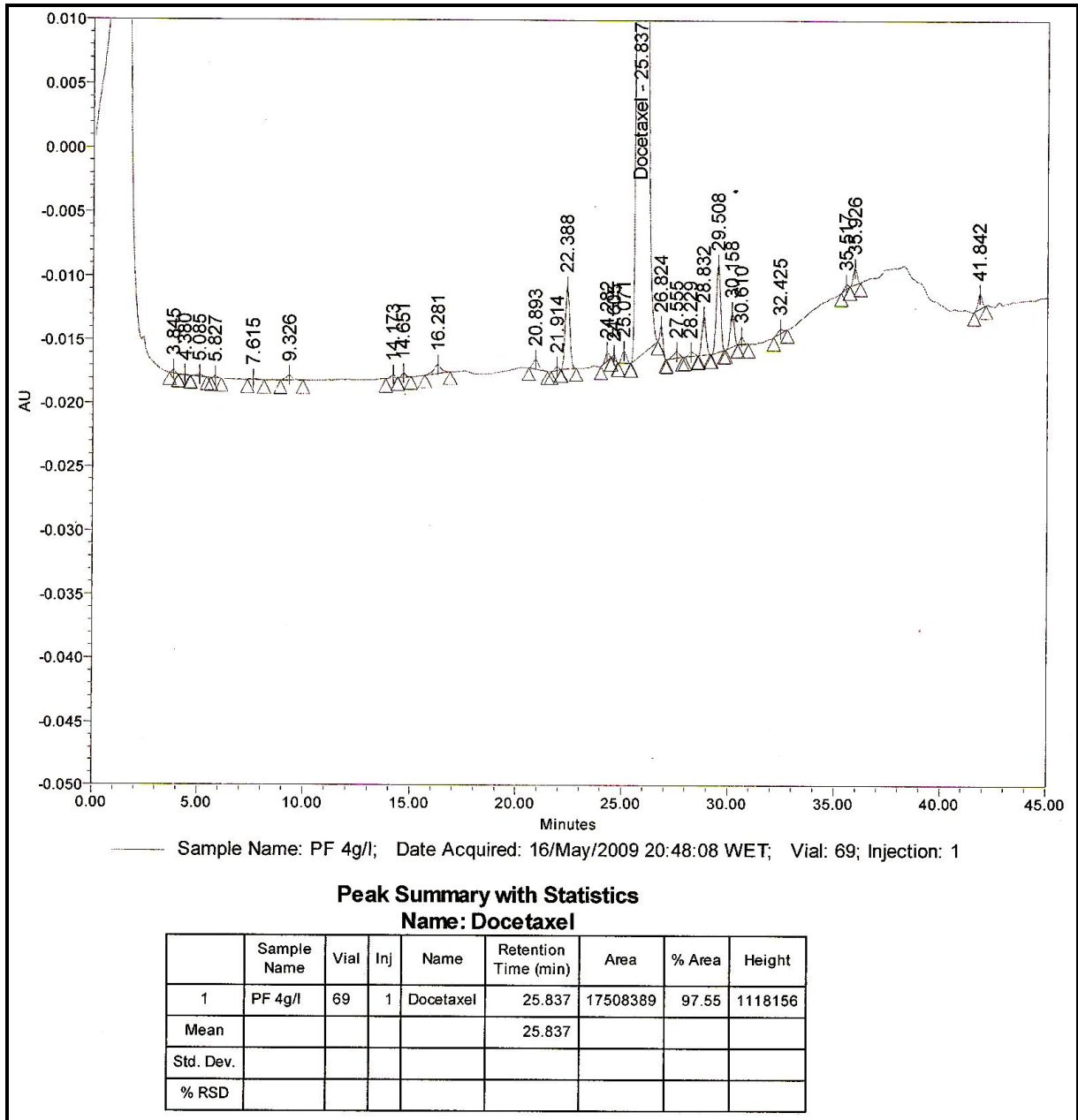
### Peak Summary with Statistics Name: Docetaxel

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Purity1 Flag
1	PF ND	11	1	Docetaxel	25.343	9412519	99.45	1.098134e+005	1.558962e+000	No
Mean					25.343	9412518.7				
Std. Dev.										
% RSD										

### Peak Summary with Statistics Name:

	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Purity1 Flag
1	PF ND	11	1	6.800	5599	0.06	7.706295e+003	9.986379e-001	No
2	PF ND	11	1	22.218	5335	0.06	5.801141e+004	1.229380e+000	No
3	PF ND	11	1	28.265	9661	0.10	8.124144e+004	1.007546e+000	No
4	PF ND	11	1	28.783	14826	0.16	1.456983e+005	1.141113e+000	No
5	PF ND	11	1	30.638	1973	0.02	2.351520e+005	1.003439e+000	No
6	PF ND	11	1	27.744	13078	0.14	1.413020e+005	1.111901e+000	No
7	PF ND	11	1	24.775	1782	0.02	1.916787e+005	8.077835e-001	No
Mean				24.175	7464.9				
Std. Dev.				8.150	5179.9				
% RSD				33.71	69.4				

**Chromatogramme 7 :** Résultats de l'analyse de l'essai non dégradé du produit fini 1g/l par la troisième méthode chromatographique



**Chromatogramme 8 :** Résultats de l'analyse de l'essai non dégradé du produit fini 4g/l par la troisième méthode chromatographique

Les résultats des chromatogrammes du standard, de l'essai non dégradé de la matière première et de l'essai non dégradé du produit fini, vont nous servir au calcul du taux de dégradation de chaque essai dégradé (de la matière première ou du produit fini) par les différentes conditions de stress.

Le deuxième chromatogramme analysé par la première méthode d'analyse sert au calcul du taux de dégradation des différents essais préliminaires.

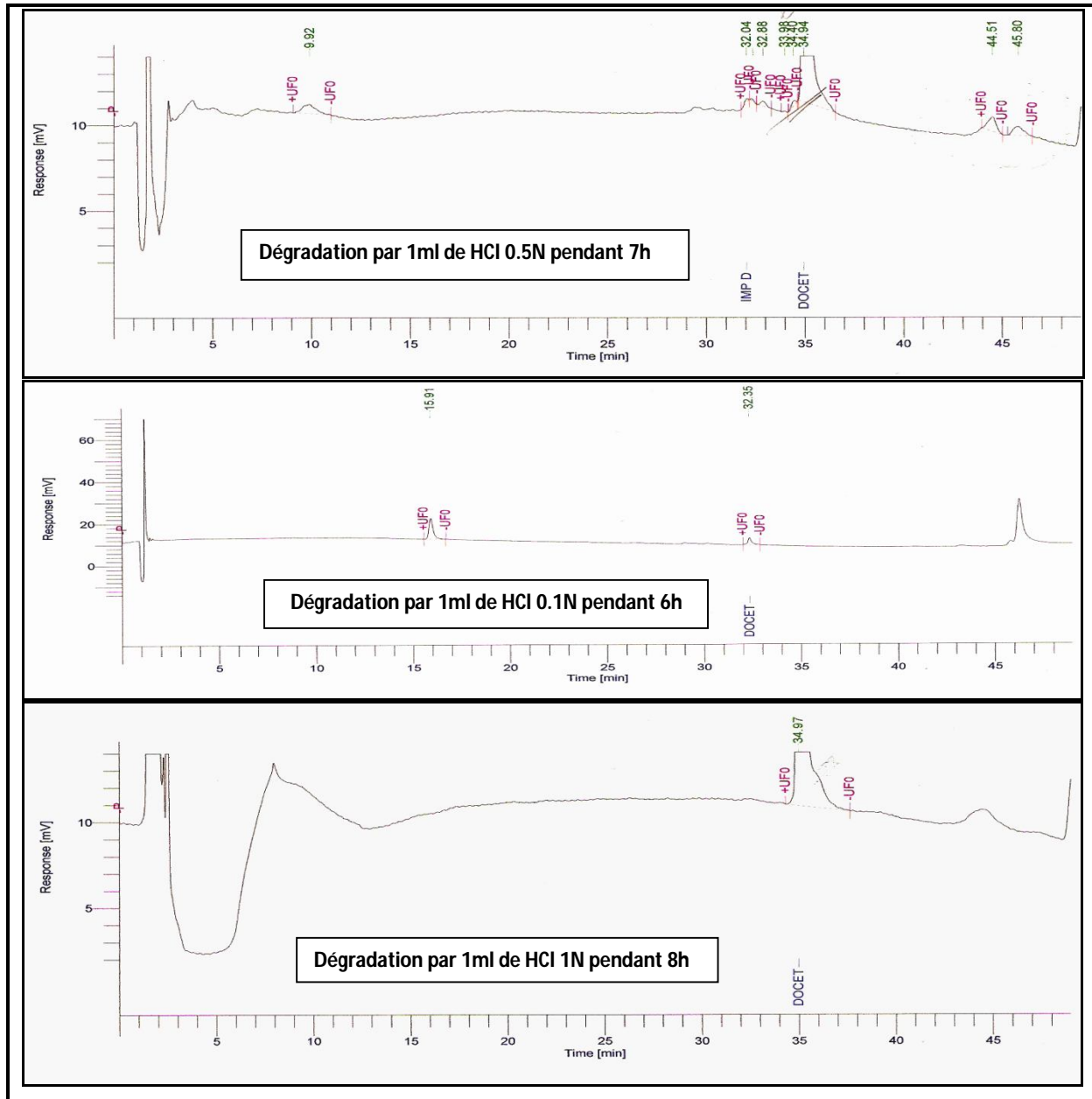
## **2. Résultats des essais préliminaires de la dégradation forcée**

Les résultats des essais préliminaires réalisés sur l'échantillon de Docetaxel soumis à différentes conditions de stress sont résumés dans le **Tableau X**.

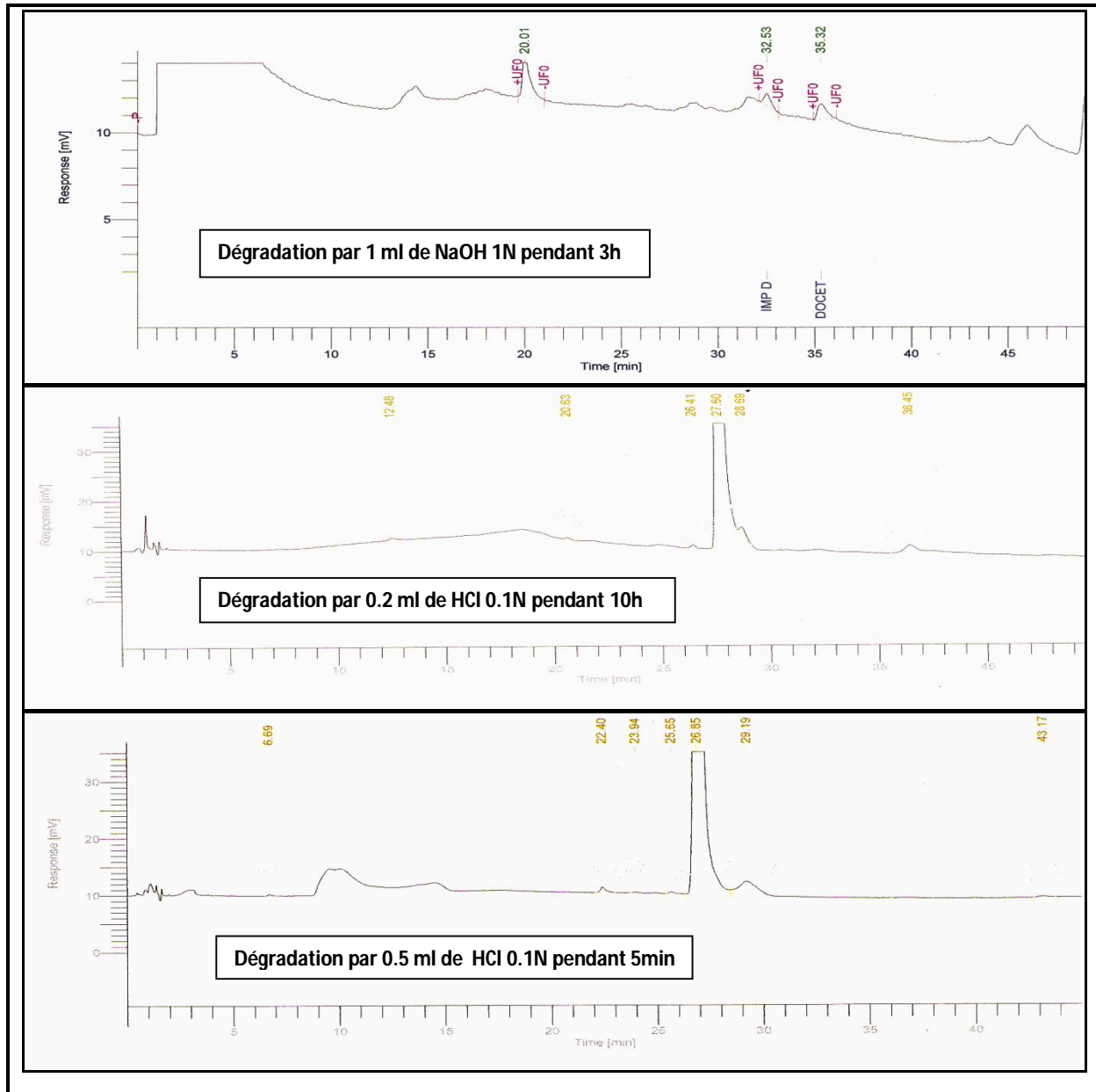
# Résultats | Partie Pratique

**Tableau X :** Résultats des essais préliminaires de dégradation forcée de Docetaxel

Essais préliminaires		Volume (ml)	Volume final (ml)	Durée d'exposition	Aire du Docetaxel dans l'essai non dégradé (A)	Aire du Docetaxel dans l'essai dégradé (B)	Taux de dégradation $\frac{A - B}{A} \times 100$	Chromatogramme
Dégradation hydrolytique par l'acide	HCl 1N	1ml	5	8h	7422074.68	581623.51	92%	11
	HCl 0,5N	1ml	5	7h	7422074.68	1035420.33	86%	9
	HCl 0,1N	1ml	5	6h	8082274.63	42875.24	99%	10
	HCl 0,1N	0,5ml	2,5	5min	6028914.54	3849767.03	50%	14
	HCl 0,1N	0,2ml	2ml	10h	5703705.26	5106762.83	0.1%	12
Dégradation hydrolytique par la base	NaOH 1N	1ml	5	3h	7422074.68	29984.45	99%	17
	NaOH 0,1N	1ml	5	3h30	7422074.68	19703.57	99%	13
	NaOH 0,01N	0.2ml	2	5j	7422074.68	7136521.62	0.03%	15
	NaOH 0.05N	1ml	2.5	5min	6102869.38	1632786.29	64%	16
Dégradation oxydative Peroxyde d'hydrogène	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	1.5ml	2.5	45min	6839406.05	1362857.60	88%	21
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	0.5ml	2.5	5min	6839406.05	3898461.45	43%	22
Dégradation photolytique	λ = 254nm λ = 365nm 400 à 800 nm	-	-	19h	5703705.26	4295643.02	24%	18
				24h	5703705.26	162948.63	97%	19
Dégradation thermolytique	70°C	-	-	14h	5703705.26	3036233.01	46%	20

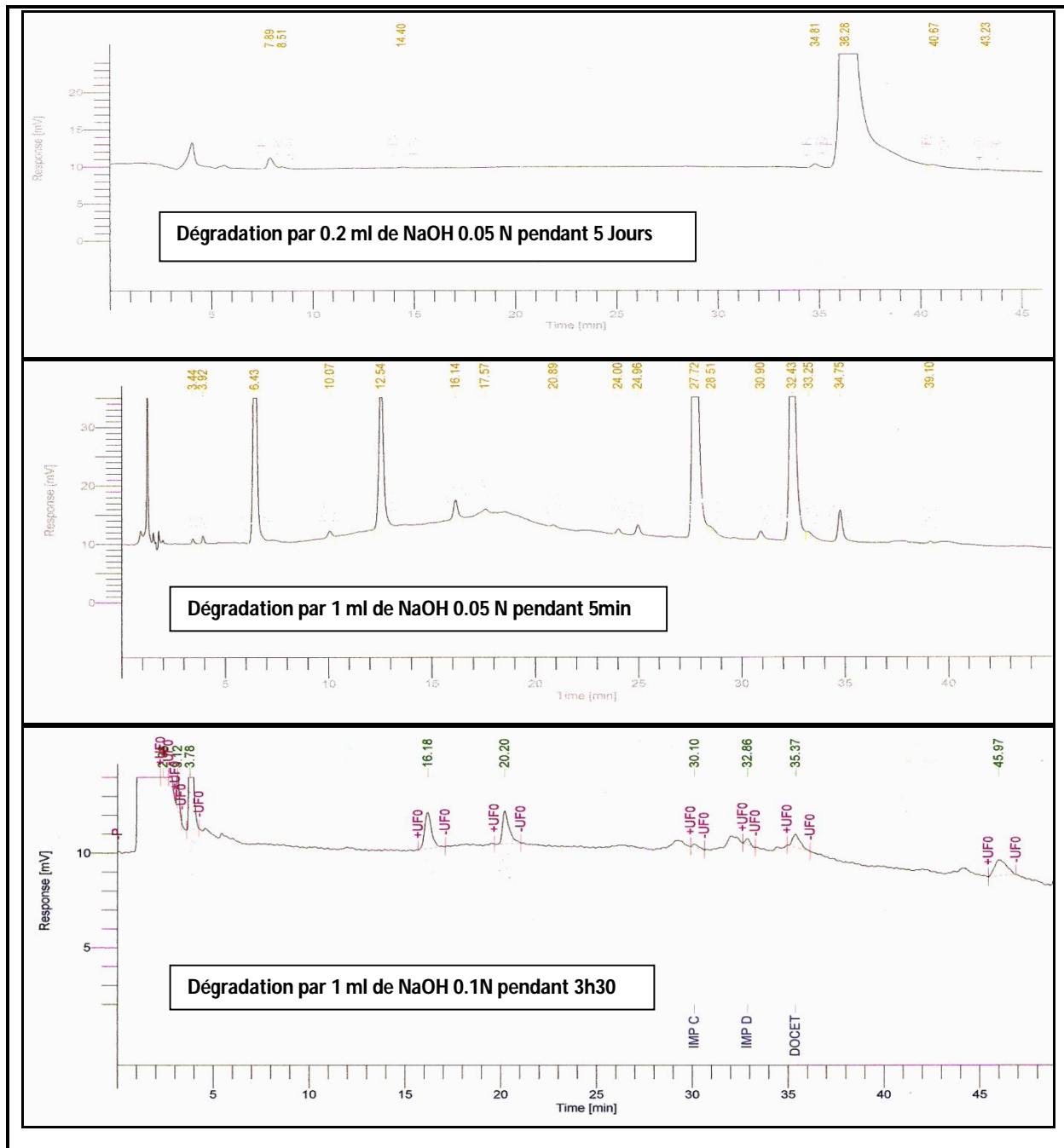


**Chromatogramme 9,10,11:** Résultats de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradée (étude préliminaire)

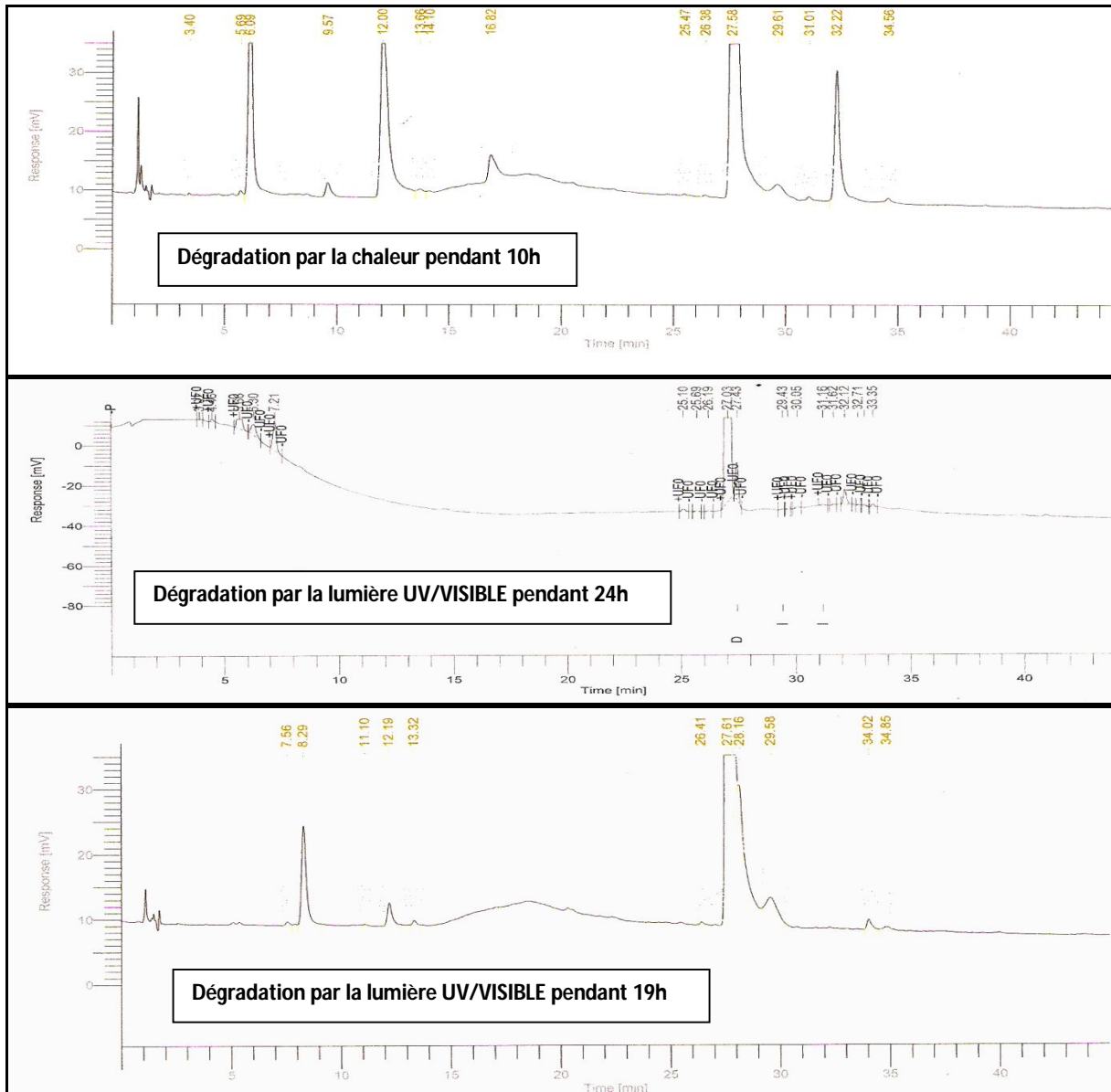


**Chromatogramme 12,13,14** : Résultats de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradée (étude préliminaire)

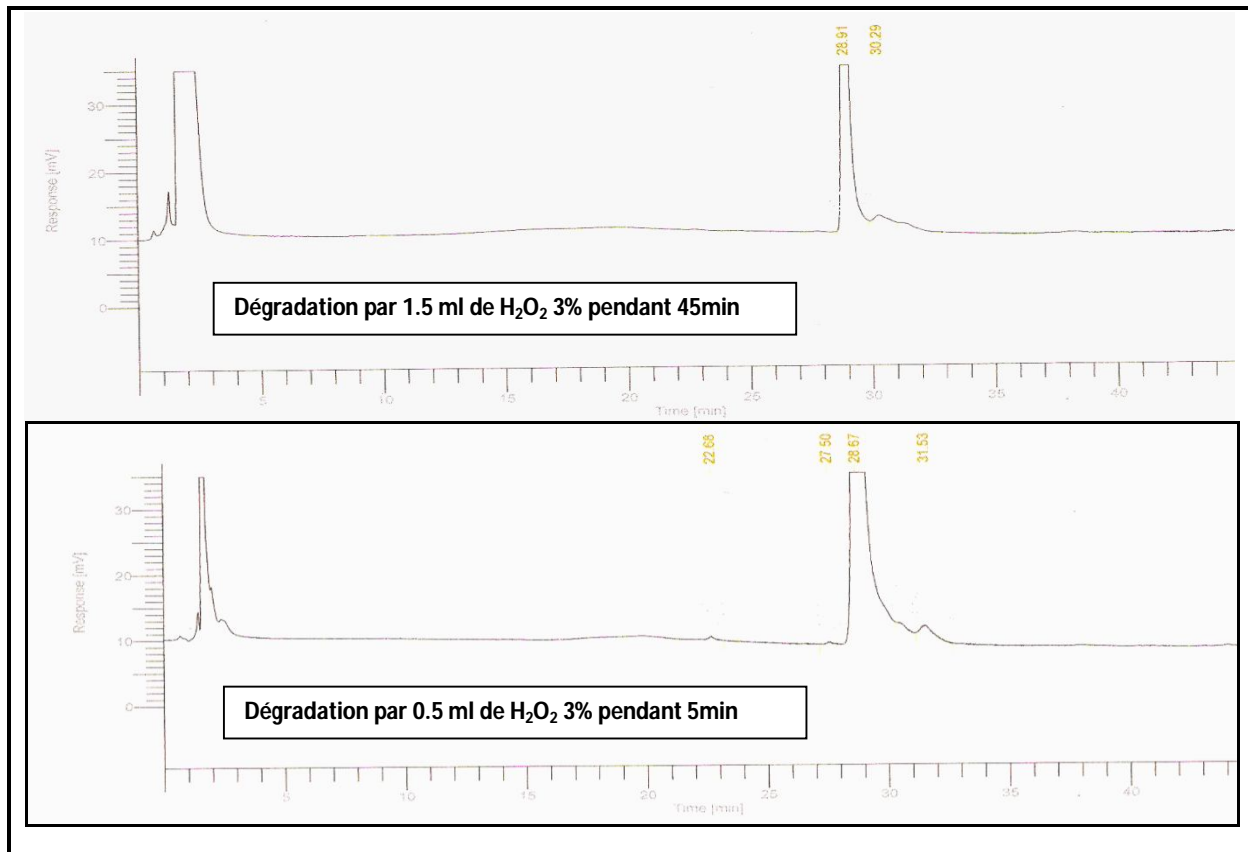




**Chromatogramme 15,16,17 :** Résultats de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradée (étude préliminaire)



**Chromatogramme 18,19,20** : Résultats de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradée (étude préliminaire)



**Chromatogramme 21:** Résultats de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradée (étude préliminaire)

### **3. Résultats de la dégradation forcée du Docetaxel (Matière Première)**

A partir des résultats des essais préliminaires, nous avons déduit les conditions optimales de la dégradation forcée qui sont les suivantes :

- Dégradation hydrolytique par la base : 0.6 ml de l'hydroxyde de sodium à 0.05N ajouté à la solution mère de notre échantillon pour avoir un volume total de 2,5 ml.
- Dégradation hydrolytique par l'acide : 0.5 ml de l'acide chlorhydrique à 0.1N ajouté à la solution mère de notre échantillon pour avoir un volume total de 3 ml.
- Dégradation oxydative : 0.2 ml du peroxyde d'hydrogène à 3% ajouté à la solution mère de notre échantillon pour avoir un volume total de 2,5 ml
- Dégradation photolytique : on a exposé l'échantillon aux rayonnements UV pendant 19h comme décrit précédemment dans les essais préliminaires.
- Dégradation thermolytique : notre échantillon est placé dans l'étuve à 70 °C pendant 10h.
- Nous préparons également des blancs dégradés par chaque condition de stress.

Les résultats du test de stress réalisés sur l'échantillon de Docetaxel soumis à différentes conditions de stress sont résumés dans les **Tableau XI et Tableau XII**.

Le blanc dégradé par la chaleur, lumière, la base, l'acide et le peroxyde d'hydrogène est représenté séparément dans les chromatogrammes 22, 23, 24, 25, 26.

**Tableau XI** : Résultats des essais de dégradation hydrolytique et oxydative de Docetaxel en tant que matière première

Essais de dégradation forcée		Volume (ml)	Volume final (ml)	Durée d'exposition	Taux de dégradation	Taux apparent des impuretés	Chromatogramme n°
Solution basique	NaOH 0.05N	2.5	0.8	5min	68%	28%	Chromatogramme 27
		2.5	0.6	3h	41%	2.5%	Chromatogramme 28
Solution acide	HCl 0.1N	3	0.5	5min	37%	–	Chromatogramme 29
Peroxyde d'hydrogène	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	2.5	0.2	5min	38%	–	Chromatogramme 30

**Tableau XII** : Résultats des essais de dégradation forcée thermolytique et photolytique de Docetaxel en tant que matière première

Essais de dégradation forcée		Durée d'exposition	Taux de dégradation	Taux apparent des impuretés	Chromatogramme n°
Lumière	λ = 254nm ; λ = 365nm Visible : 400 à 800 nm	19h	6.7%	0.44%	Chromatogramme 31
		24h	92%	53.4%	Chromatogramme 32
Chaleur	70°C	10h	12%	0.43%	Chromatogramme 33

**Tableau XIII** : Résultat de l'analyse chromatographique d'un échantillon rassemblant les essais dégradés par la chaleur la lumière et la base

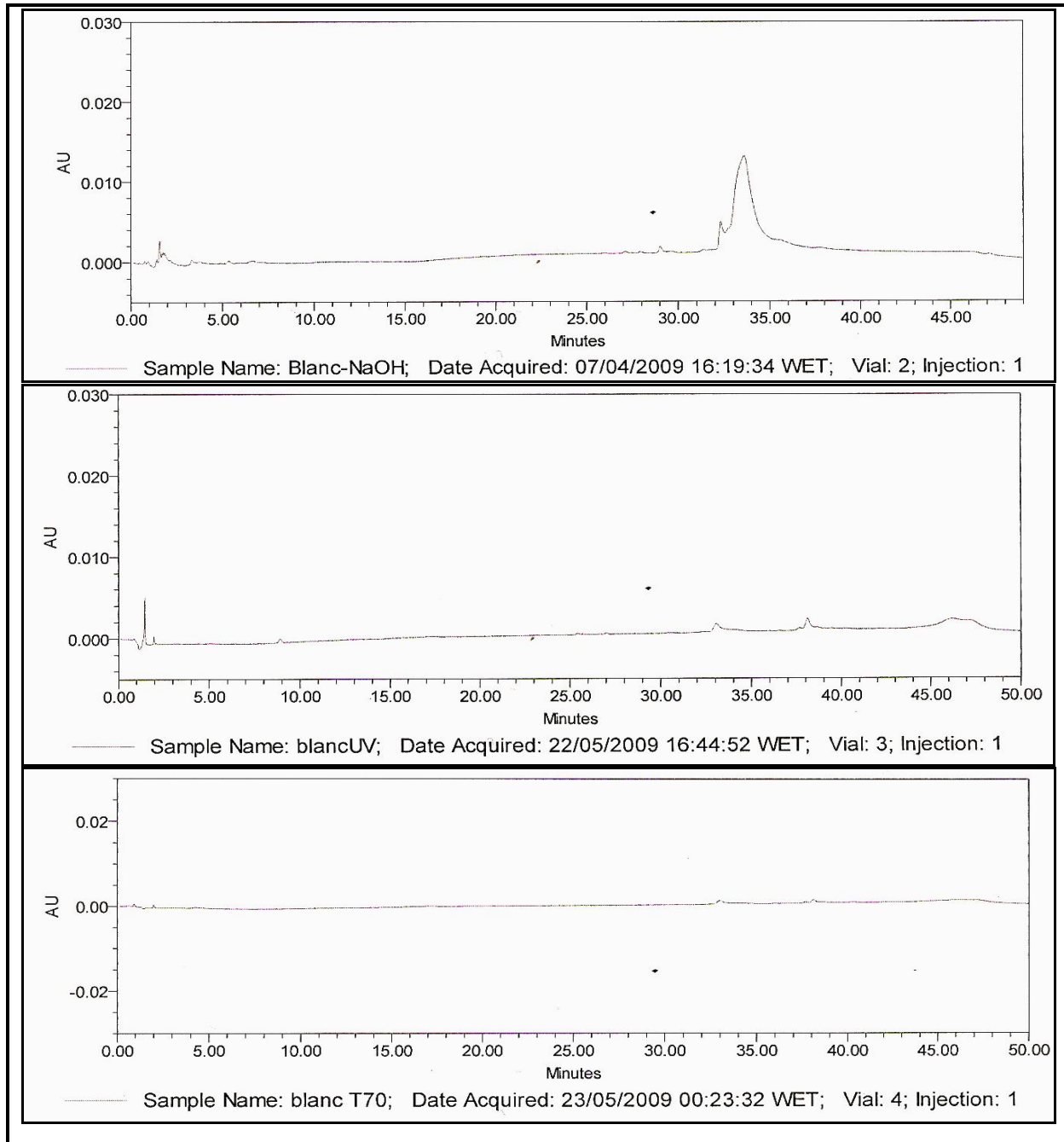
	<b>Volume prélevé de chaque essai (ml)</b>	<b>Volume final obtenu (ml)</b>	<b>Chromatogramme</b>
Mélange des essais (22, 27, 28)	1ml	3ml	Chromatogramme 34

**Tableau XIV** : Résultats des essais de la dégradation forcée du Docetaxel (MP)

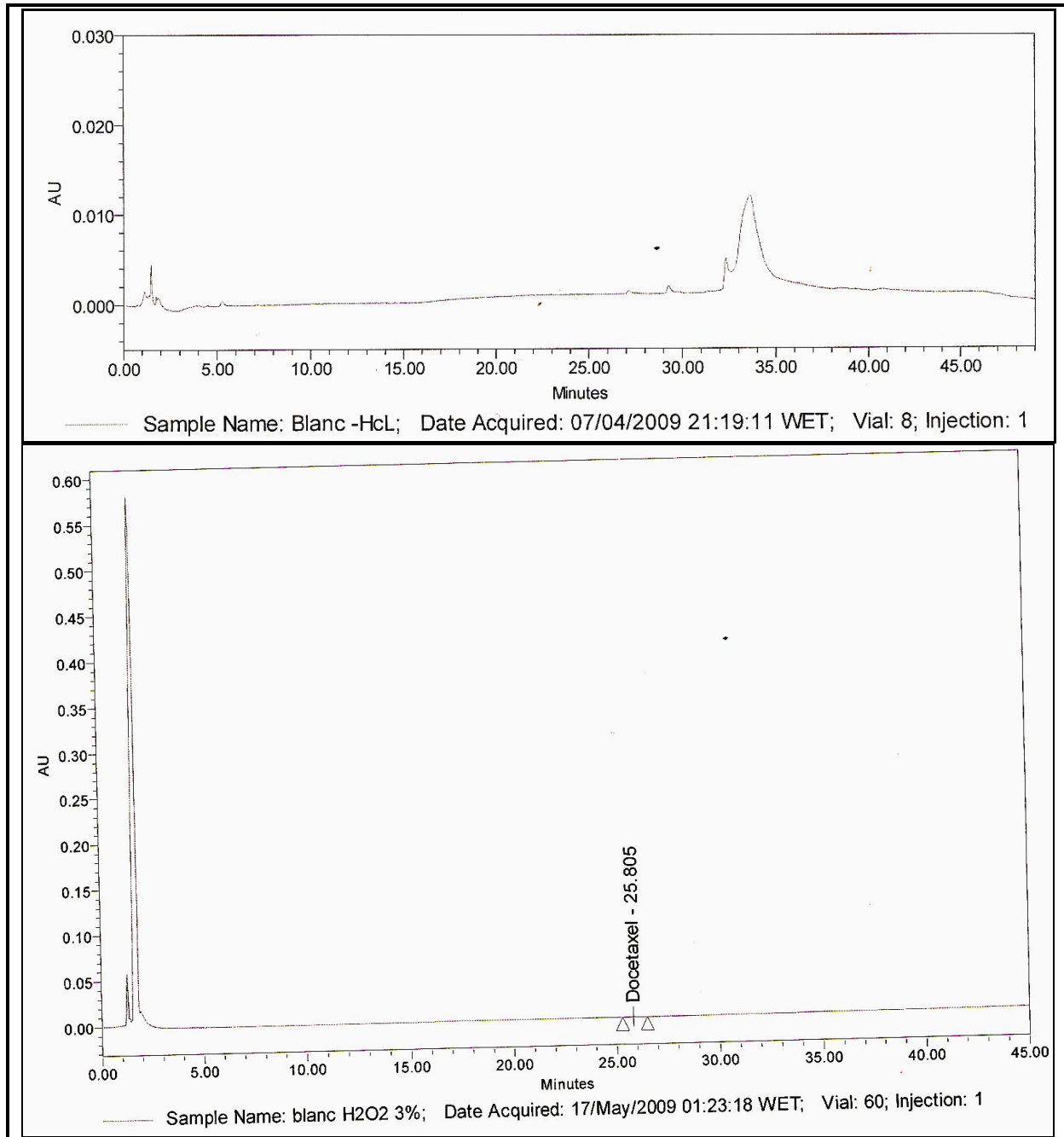
	<b>Temps de rétention relatif T<sub>Rr</sub></b>	<b>0.26</b>	<b>0.3</b>	<b>0.47</b>	<b>0.96</b>	<b>1.13</b>	<b>1.2</b>	<b>1.7</b>
NaOH 0,05N (chromatogramme 22)	Temps de rétention	6.87	–	11.97	24.42	28.88	30.74	–
	% Aire	2	–	1.28	0.06	37.51	0.31	–
NaOH 0,05N (chromatogramme 23)	Temps de rétention	6.69	–	11.87	24.45	28.88	30.74	–
	% Aire	0.18	–	0.06	0.12	4.93	0.02	–
HCl 0.1 N (chromatogramme 24)	Temps de rétention	–	–	–	24.89	–	–	–
	% Aire	–	–	–	0.01	–	–	–
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% (chromatogramme 25)	Temps de rétention	–	–	–	24.44	–	30.68	–
	% Aire	–	–	–	0.14	–	0.42	–
Lumière UV/Visible (chromatogramme 26)	Temps de rétention	7.27	8.85	11.44	24.44	28.94	30.57	–
	% Aire	0.05	2.95	1.28	0.22	0.04	0.39	–
Lumière UV/Visible (chromatogramme 27)	Temps de rétention	7.21	8.86	11.38	24.8	–	30.49	–
	% Aire	0.11	31.09	16.22	0.12	–	3.62	–
Chaleur 70°C (chromatogramme 28)	Temps de rétention	6.62	–	–	24.37	28.83	–	43.3
	%Aire	0.13	–	–	0.13	0.83	–	1.07

**Tableau XV** : Résultats de l'analyse chromatographique d'un échantillon rassemblant les essais dégradés par la chaleur, la lumière et la base

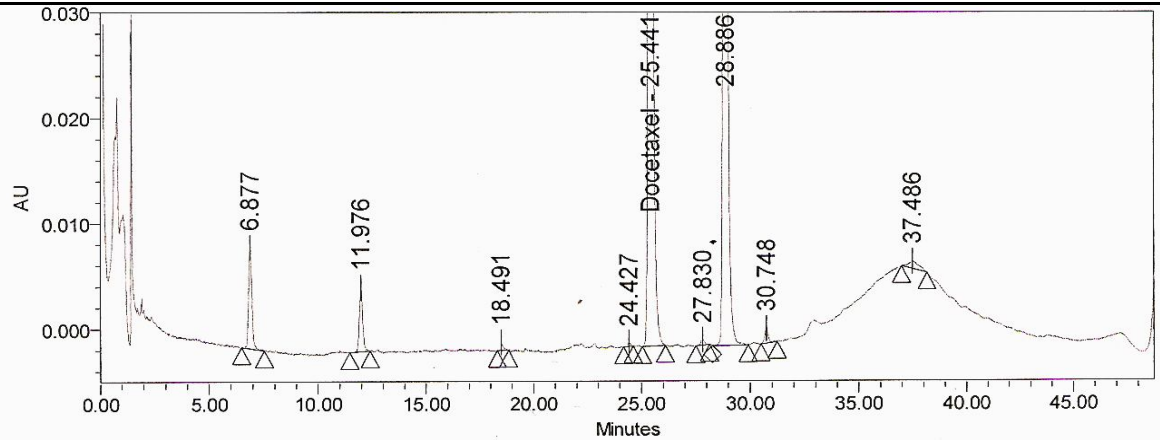
	<b>Temps de rétention relatif</b>	<b>0.26</b>	<b>0.3</b>	<b>0.47</b>	<b>0.96</b>	<b>1.13</b>	<b>1.2</b>	<b>1.7</b>
Mélange des échantillons (22, 27, 28)	Temps de rétention	–	9.01	11.43	24.41	28.86	30.50	42.02
	%Aire	–	1.82	1.08	0.14	3.47	0.05	0.07



**Chromatogramme 22,23,24** : Résultats de l'analyse chromatographique du blanc dégradé par NaOH, la lumière, et la chaleur séparément



**Chromatogramme 25,26 :** Résultat de l'analyse chromatographique du blanc dégradé par HCl et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> séparation



Sample Name: MP NaOH0.6ml; Date Acquired: 28/05/2009 11:43:48 WET; Vial: 17; Injection: 1

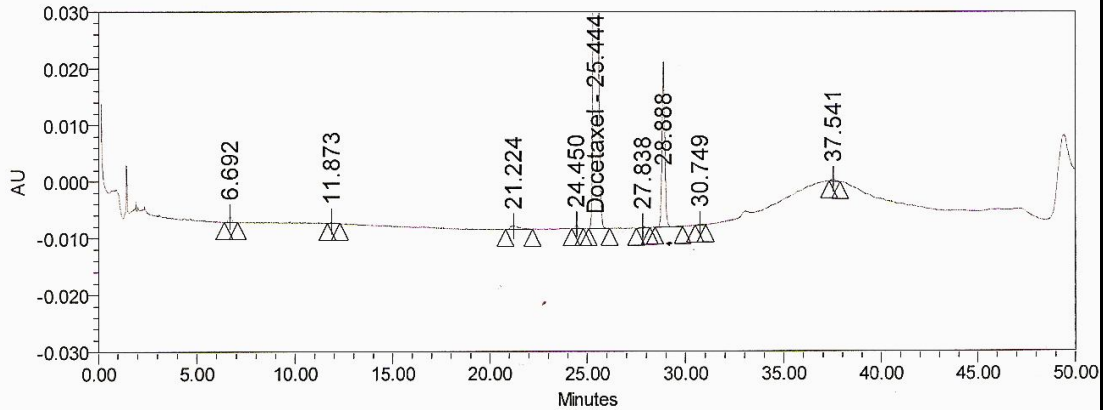
**Peak Summary with Statistics**  
Name: Docetaxel

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Purity1 Flag
1	MP NaOH0.6ml	17	1	Docetaxel	25.441	2925489	57.80	1.591918e+005	1.123072e+000	No
	Mean				25.441	2925489.4				
	Std. Dev.									
	% RSD									

**Peak Summary with Statistics**  
Name:

	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Purity1 Flag
1	MP NaOH0.6ml	17	1	6.877	102084	2.02	1.048788e+004	1.232936e+000	No
2	MP NaOH0.6ml	17	1	11.976	65456	1.29	3.102284e+004	1.133672e+000	No
3	MP NaOH0.6ml	17	1	27.830	7174	0.14	1.351856e+005	8.482525e-001	No
4	MP NaOH0.6ml	17	1	30.748	15962	0.32	2.249159e+005	8.098796e-001	No
5	MP NaOH0.6ml	17	1	37.486	23086	0.46	3.472154e+004	1.173596e+000	No
6	MP NaOH0.6ml	17	1	28.886	1912531	37.79	1.761956e+005	1.116133e+000	No
7	MP NaOH0.6ml	17	1	18.491	6000	0.12	2.233420e+005	1.049425e+000	No
8	MP NaOH0.6ml	17	1	24.427	3297	0.07	1.825696e+005	8.304088e-001	No
	Mean			23.340	266948.4				
	Std. Dev.			10.217	665826.4				
	% RSD			43.78	249.4				

**Chromatogramme 27** : Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par 0.8 ml de NaOH 0.05N.



Sample Name: MP NaOH0.6ml; Date Acquired: 28/05/2009 02:44:13 WET; Vial: 17; Injection: 1

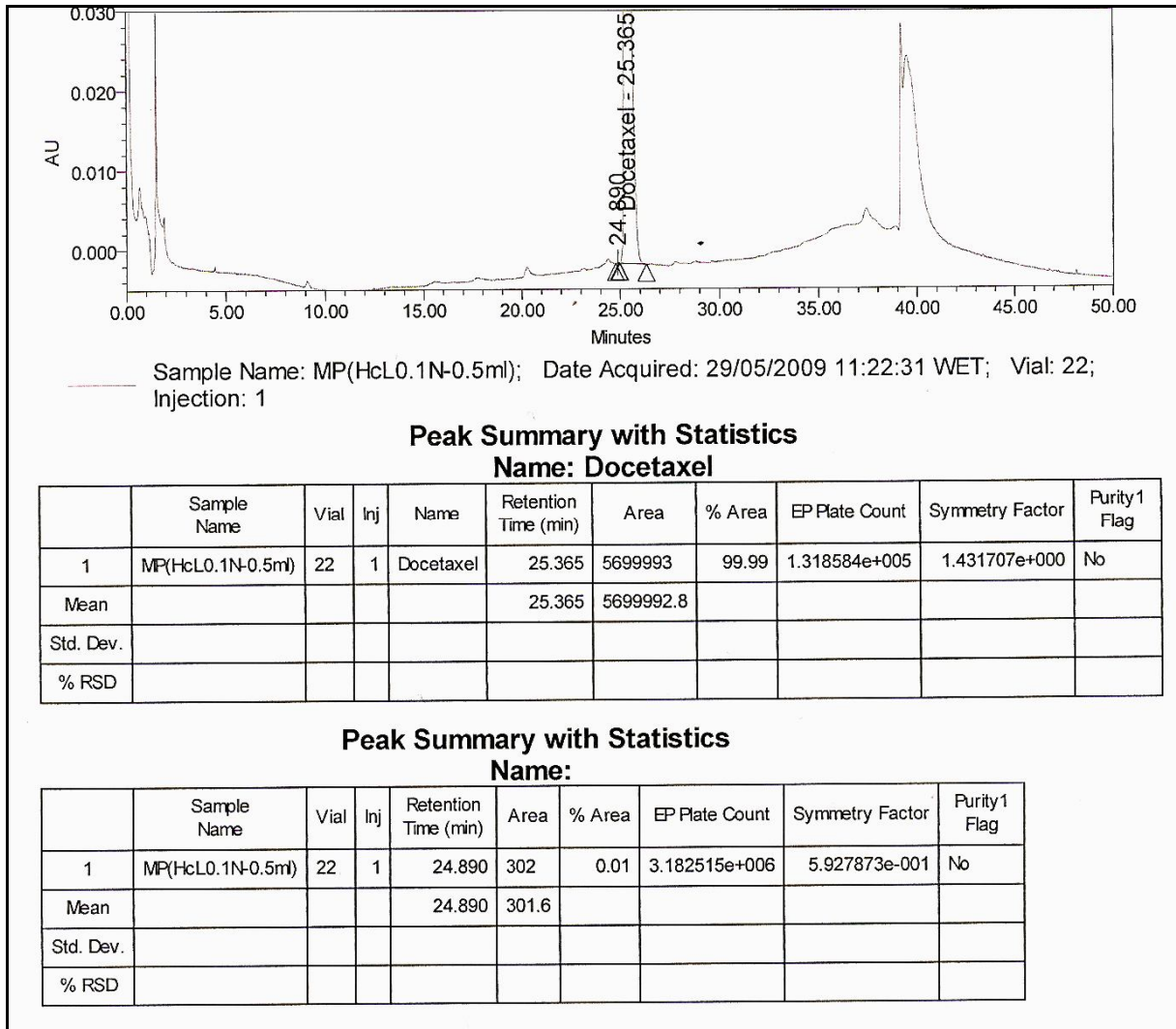
**Peak Summary with Statistics**  
Name: Docetaxel

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Purity1 Flag
1	MP NaOH0.6ml	17	1	Docetaxel	25.444	5396314	94.17	1.685022e+005	1.072057e+000	No
Mean					25.444	5396314.2				
Std. Dev.										
% RSD										

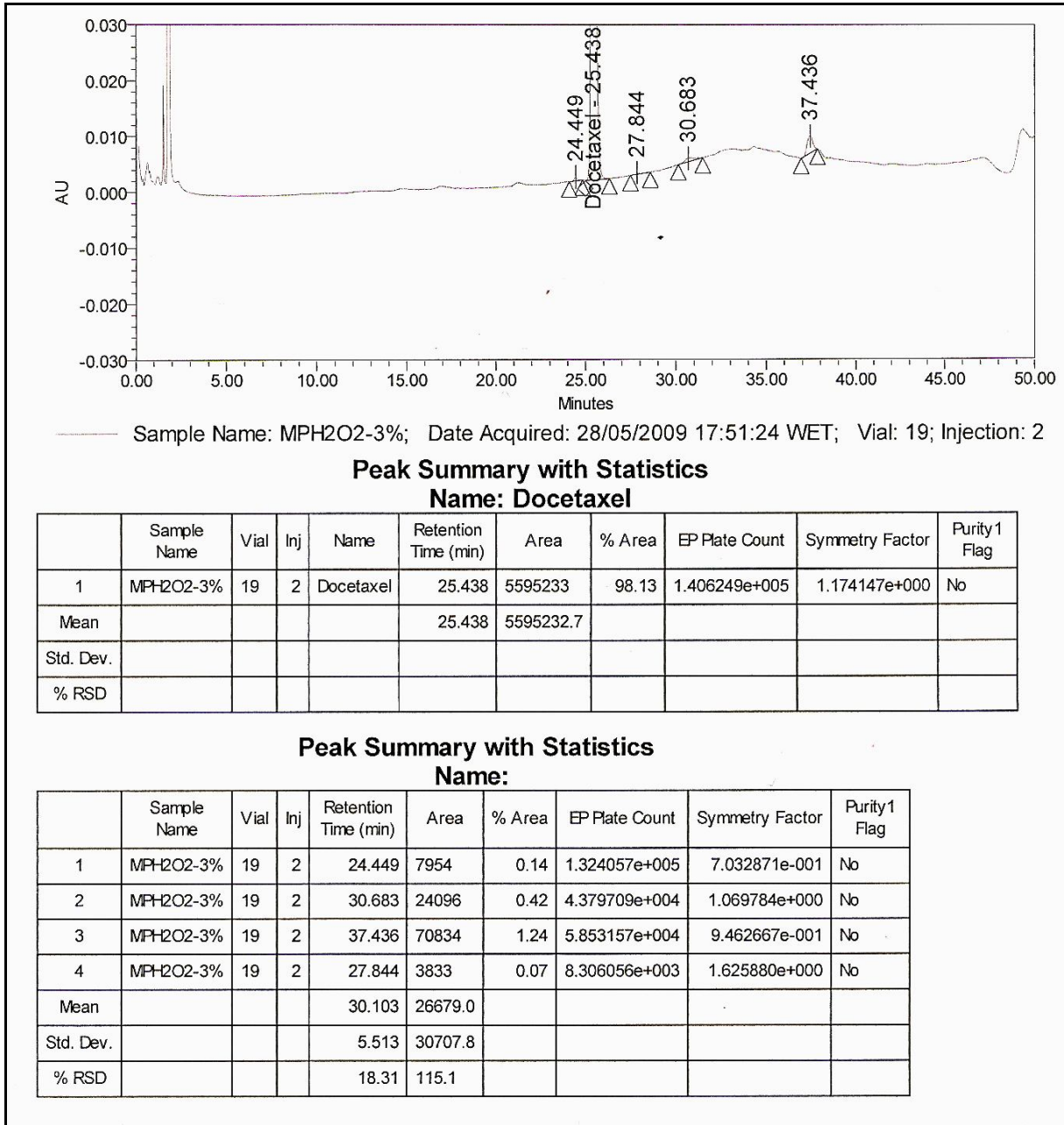
**Peak Summary with Statistics**  
Name:

	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Purity1 Flag
1	MP NaOH0.6ml	17	1	11.873	3400	0.06	4.935819e+004	7.846468e-001	No
2	MP NaOH0.6ml	17	1	21.224	18951	0.33	1.550463e+004	1.668973e+000	No
3	MP NaOH0.6ml	17	1	28.888	282380	4.93	1.858599e+005	1.047652e+000	No
4	MP NaOH0.6ml	17	1	37.541	6318	0.11	9.895214e+004	1.155290e+000	No
5	MP NaOH0.6ml	17	1	6.692	10344	0.18	1.068041e+004	1.105664e+000	No
6	MP NaOH0.6ml	17	1	30.749	1420	0.02	3.176383e+005	7.102019e-001	No
7	MP NaOH0.6ml	17	1	27.838	4460	0.08	1.655559e+005	8.374162e-001	No
8	MP NaOH0.6ml	17	1	24.450	6860	0.12	1.843083e+005	9.982997e-001	No
Mean				23.657	41766.5				
Std. Dev.				10.150	97372.4				
% RSD				42.90	233.1				

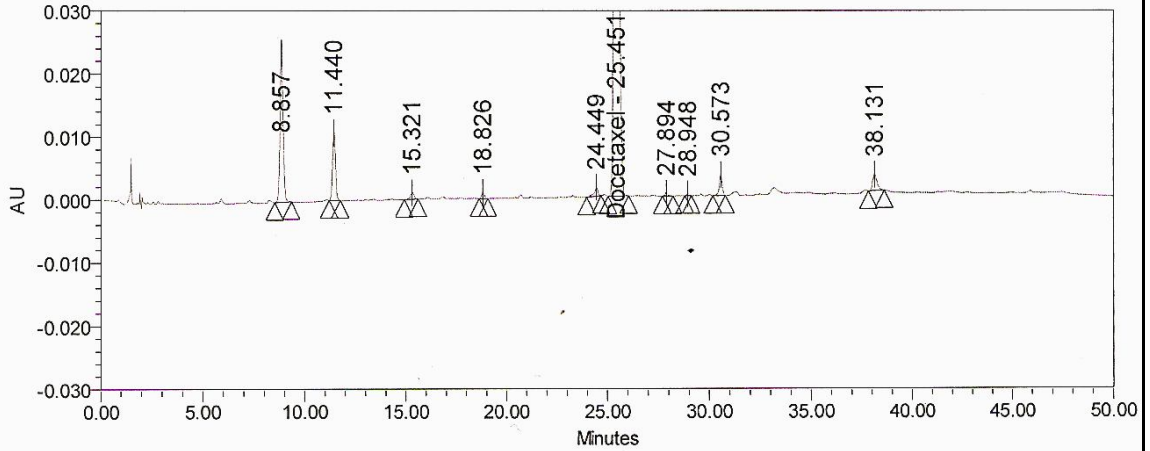
**Chromatogramme 28:** Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par 0.6 ml de NaOH 0.05N.



**Chromatogramme 29:** Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par 0.5 ml de HCl 0.1N.



**Chromatogramme 30:** Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par 0.2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> %



Sample Name: mpUV; Date Acquired: 22/05/2009 12:31:03 WET; Vial: 5; Injection: 1

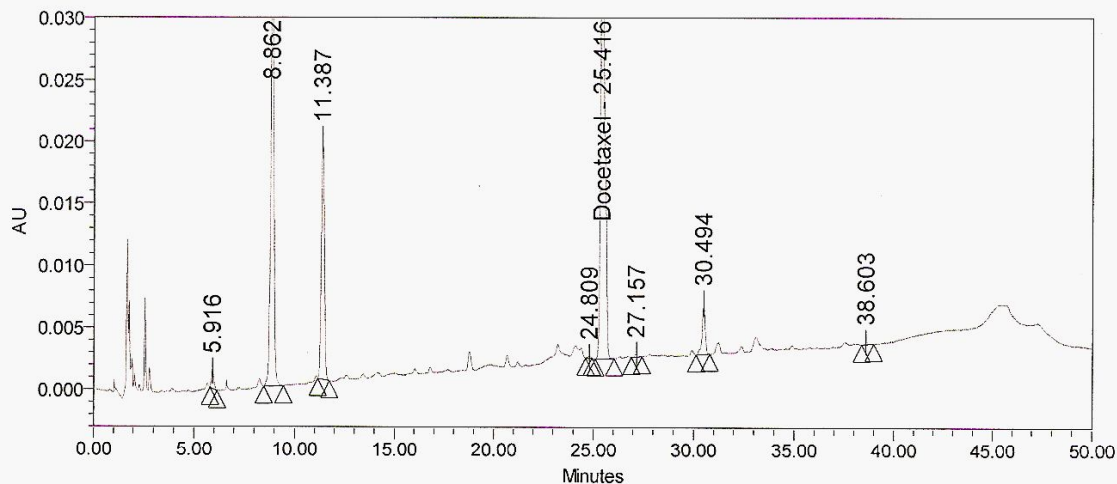
**Peak Summary with Statistics**  
Name: Docetaxel

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Purity1 Flag
1	mpUV	5	1	Docetaxel	25.451	8032470	94.29	No
Mean					25.451	8032469.9		
Std. Dev.								
% RSD								

**Peak Summary with Statistics**  
Name:

	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	Purity1 Flag
1	mpUV	5	1	8.857	253567	2.98	No
2	mpUV	5	1	11.440	109749	1.29	No
3	mpUV	5	1	15.321	13418	0.16	Yes
4	mpUV	5	1	28.948	3030	0.04	No
5	mpUV	5	1	38.131	38543	0.45	No
6	mpUV	5	1	30.573	33620	0.39	No
7	mpUV	5	1	27.894	5139	0.06	No
8	mpUV	5	1	18.826	10382	0.12	Yes
9	mpUV	5	1	24.449	19141	0.22	Yes
Mean				22.715	54065.3		
Std. Dev.				9.728	81654.0		
% RSD				42.83	151.0		

**Chromatogramme 31** : Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par la lumière UV/VISIBLE pendant 19h



Sample Name: MPuv; Date Acquired: 26/05/2009 18:47:08 WET; Vial: 5; Injection: 2

### Peak Summary with Statistics

Name: Docetaxel

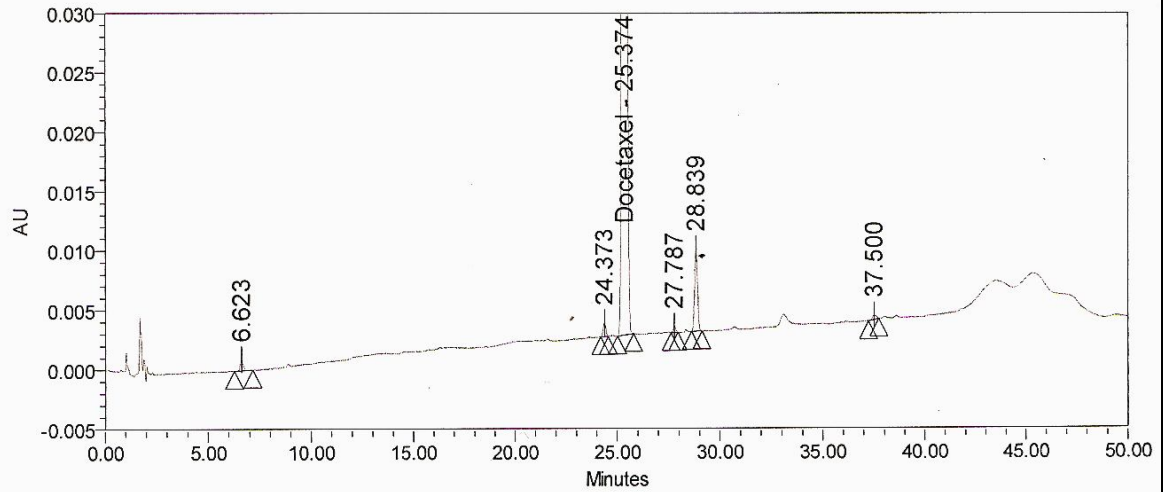
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	MPuv	5	2	Docetaxel	25.416	588751	47.62	1.422577e+005	1.440189e+000
Mean					25.416	588750.6			
Std. Dev.									
% RSD									

### Peak Summary with Statistics

Name:

	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	MPuv	5	2	5.916	11939	0.97	1.088202e+004	1.261880e+000
2	MPuv	5	2	8.862	384355	31.09	1.624955e+004	1.078014e+000
3	MPuv	5	2	27.157	2432	0.20	1.521539e+005	7.890659e-001
4	MPuv	5	2	38.603	2009	0.16	3.119344e+005	8.395019e-001
5	MPuv	5	2	30.494	44794	3.62	2.212148e+005	7.863641e-001
6	MPuv	5	2	11.387	200501	16.22	2.815290e+004	1.109903e+000
7	MPuv	5	2	24.809	1486	0.12	1.269217e+005	8.215495e-001
Mean				21.033	92502.3			
Std. Dev.				12.381	147305.9			
% RSD				58.86	159.2			

**Chromatogramme 32:** Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par la lumière UV/VISIBLE pendant 24h



Sample Name: MP 70; Date Acquired: 26/05/2009 16:14:17 WET; Vial: 4; Injection: 1

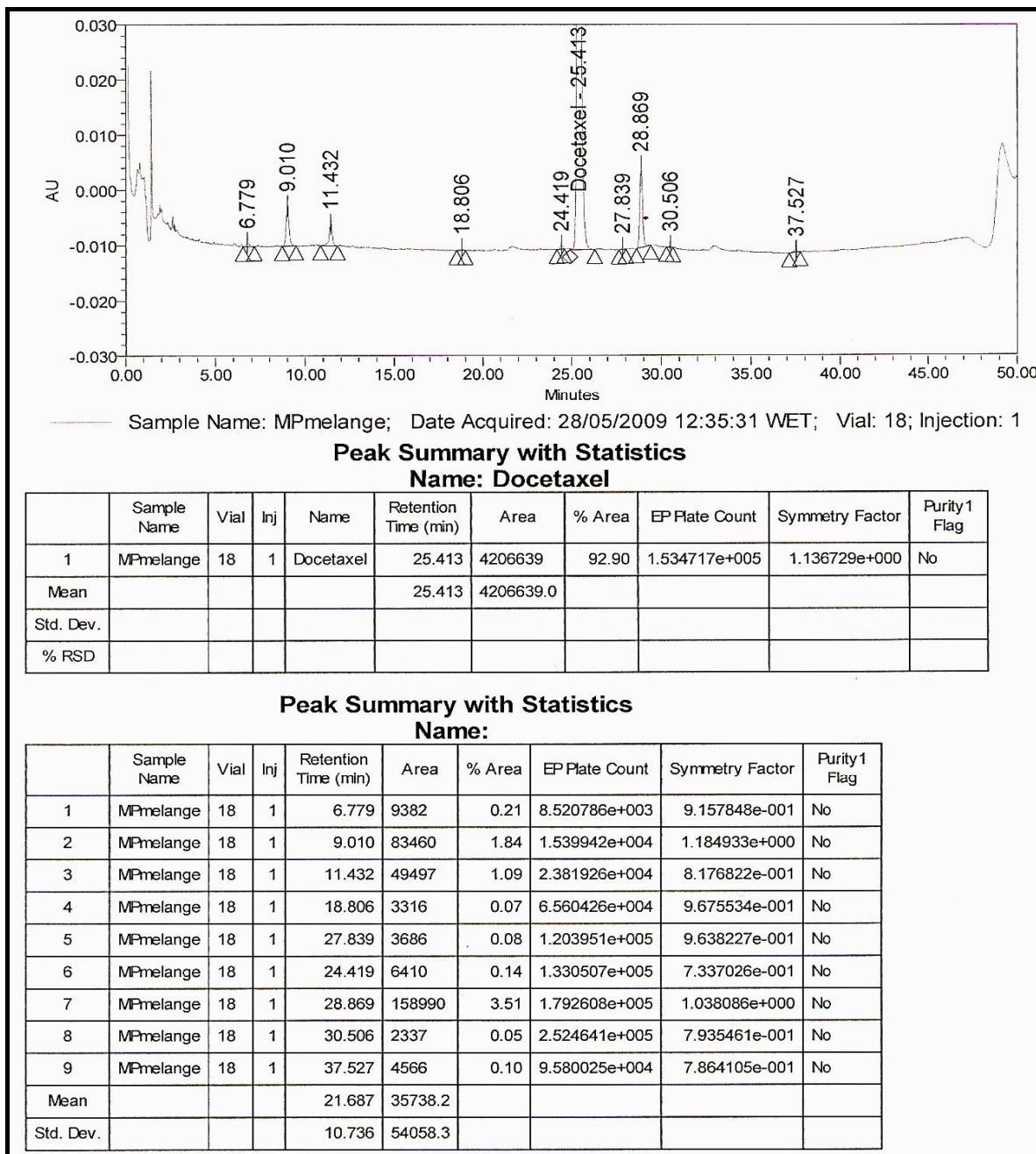
**Peak Summary with Statistics**  
Name: Docetaxel

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Purity1 Flag
1	MP 70	4	1	Docetaxel	25.374	7890378	98.77	1.704995e+005	1.044490e+000	No
Mean					25.374	7890377.7				
Std. Dev.										
% RSD										

**Peak Summary with Statistics**  
Name:

	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Purity1 Flag
1	MP 70	4	1	6.623	10373	0.13	1.006091e+004	7.538304e-001	No
2	MP 70	4	1	27.787	4492	0.06	2.230419e+005	9.588407e-001	No
3	MP 70	4	1	37.500	4591	0.06	2.019563e+005	8.683024e-001	No
4	MP 70	4	1	28.839	67991	0.85	1.962911e+005	1.027863e+000	No
5	MP 70	4	1	24.373	10715	0.13	1.592018e+005	1.069865e+000	No
Mean				25.024	19632.4				
Std. Dev.				11.367	27199.6				
% RSD				45.43	138.5				

**Chromatogramme 33** : Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par la chaleur pendant 10h



**Chromatogramme 34** : résultat de l'analyse chromatographique d'un échantillon rassemblant les essais dégradés par la chaleur la lumière et la base

#### **4. Etude de la dégradation forcée du produit fini**

D'après les résultats de la dégradation forcée de la matière première, le test de stress du produit fini est réalisé de la manière suivante :

- Dégradation hydrolytique par la base : 0.6 ml de l'hydroxyde de sodium à 0.05N ajouté au produit fini pour avoir un volume total de 2,5 ml.
- Dégradation hydrolytique par l'acide : 0.5 ml de l'acide chlorhydrique à 0.1N ajouté au produit fini pour avoir un volume total de 3 ml.
- Dégradation oxydative : 0.2 ml du peroxyde d'hydrogène à 3% ajouté au produit fini pour avoir un volume total de 2,5 ml
- Dégradation photolytique : nous avons exposé l'échantillon aux rayonnements UV pendant 16h comme décrit précédemment dans les essais préliminaires.
- Dégradation thermolytique : notre échantillon est placé dans l'étuve à 70 °C pendant 9h.
- Nous préparons également des placebos dégradés par chaque condition de stress.
- Pour calculer le taux de dégradation, nous avons tenu compte du facteur de dilution engendré par l'ajout de la base.

Les résultats du test de stress réalisés sur le produit fini de Docetaxel soumis à différentes conditions de stress sont résumés dans les **tableaux XV XVI et XVII**.

**Tableau XVI** : Résultats des essais de dégradation forcée hydrolytique et oxydative du produit fini

Essais de dégradation forcée par		Volume (ml)	Volume Final (ml)	Durée d'exposition	Taux de dégradation	% de l'aire des substances apparentées	Chromatogramme
Solution basique	NaOH 0.05N	0.6ml	2.5ml	5min	33%	1.1%	33
Solution acide	HCl 0.1N	0.5ml	3ml	5min	48%	–	34

**Tableau XVII** : Résultats des essais de dégradation forcée thermolytique et photolytique du produit fini

Essais de dégradation forcée		Durée d'exposition	Taux de dégradation	% de l'aire des substances apparentées	Chromatogramme
Lumière	$\lambda = 254\text{nm}$ ; $\lambda = 365\text{nm}$ Visible : 400 à 800 nm	16h	6.1%	0.2%	35
Chaleur	70°C	4h	17%	0.5%	36
		7h	25%	2.1%	37

**Tableau XVIII** : résultats du placebo subissant une dégradation photolytique, thermolytique et hydrolytique par NaOH

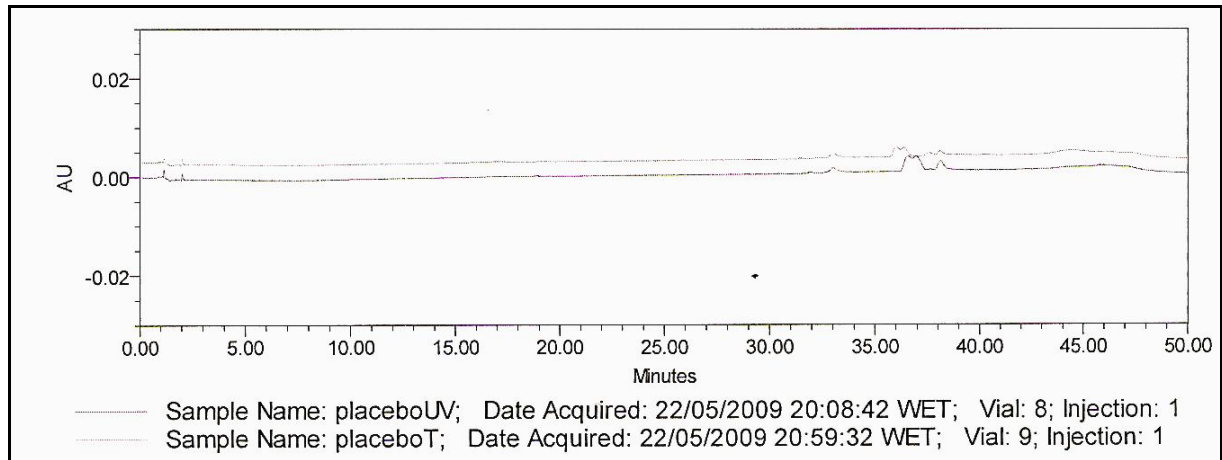
Mode de dégradation du Placebo	Durée d'exposition	Chromatogramme
Lumière UV/Visible	16h	38
Chaleur 70°C	6h	
Solution basique (NaOH 0.05N)	5min	39
Solution acide (HCl 0.1N)	5min	40

**Tableau XIX :** Résultats des essais de la dégradation forcée appliquée sur le produit fini

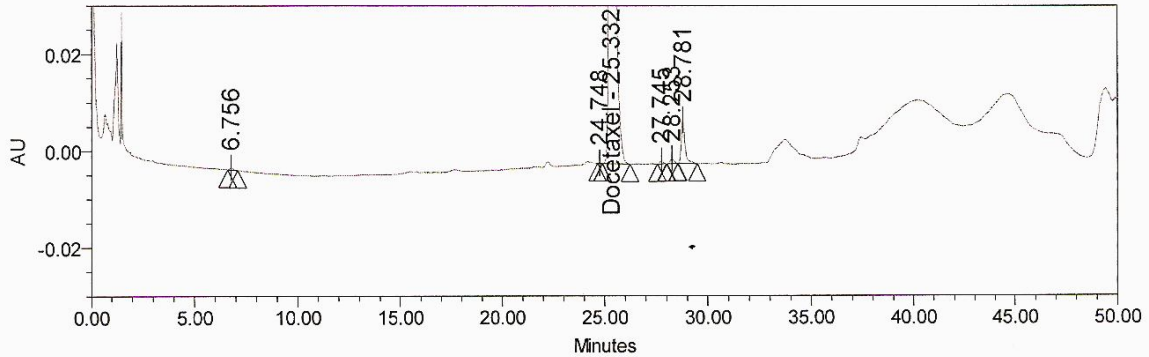
	<b>Temps de rétention relatif</b>	<b>0.26</b>	<b>0.3</b>	<b>0.47</b>	<b>0.96</b>	<b>1.13</b>	<b>1.2</b>
<b>NaOH 0,05N</b>	Temps de rétention	6.756	–	–	24.42	28.781	30.8
	%Aire	0.1	–	–	0.06	2.00	0.08
<b>Lumière</b>	Temps de rétention	7.201	8.979	11.349	24.44	28.767	30.394
	%Aire	0.05	0.96	0.31	0.22	0.15	0.15
<b>Chaleur</b>	Temps de rétention	6.633	–	11.176	24.37	28.466	30.805
	%Aire	0.09	–	0.49	0.13	0.53	0.02
<b>Chaleur</b>	Temps de rétention	6.86	–	11.4	24.22	28.39	30.76
	%Aire	0.13	–	0.05	0.04	0.62	0.04
<b>HCl 0.1 N</b>	Temps de rétention	–	–	–	24.76	–	∞∞
	%Aire	–	–	–	0.03	–	–

**Tableau XX :** les produits de dégradation générés à la fois par les conditions de stress et en étudiant la stabilité du docetaxel à long terme.

<b>Les produits de dégradation réels</b>	<b>T<sub>Rr</sub></b>	0.3	1.14	1.18
	<b>T<sub>R</sub></b>	9.32	29.5	30.61
<b>Les produits de dégradation potentiels</b>	<b>T<sub>Rr</sub></b>	0.3	1.13	1.2
	<b>T<sub>R</sub></b>	8.9	28.7	30.8



**Chromatogramme 35** : Résultats de l'analyse chromatographique du placebo dégradé par la chaleur pendant 6h et la lumière UV/VISIBLE pendant 16h séparément



Sample Name: PFNaOH0.05N(0.6ml); Date Acquired: 29/05/2009 10:28:04 WET; Vial: 21; Injection: 1

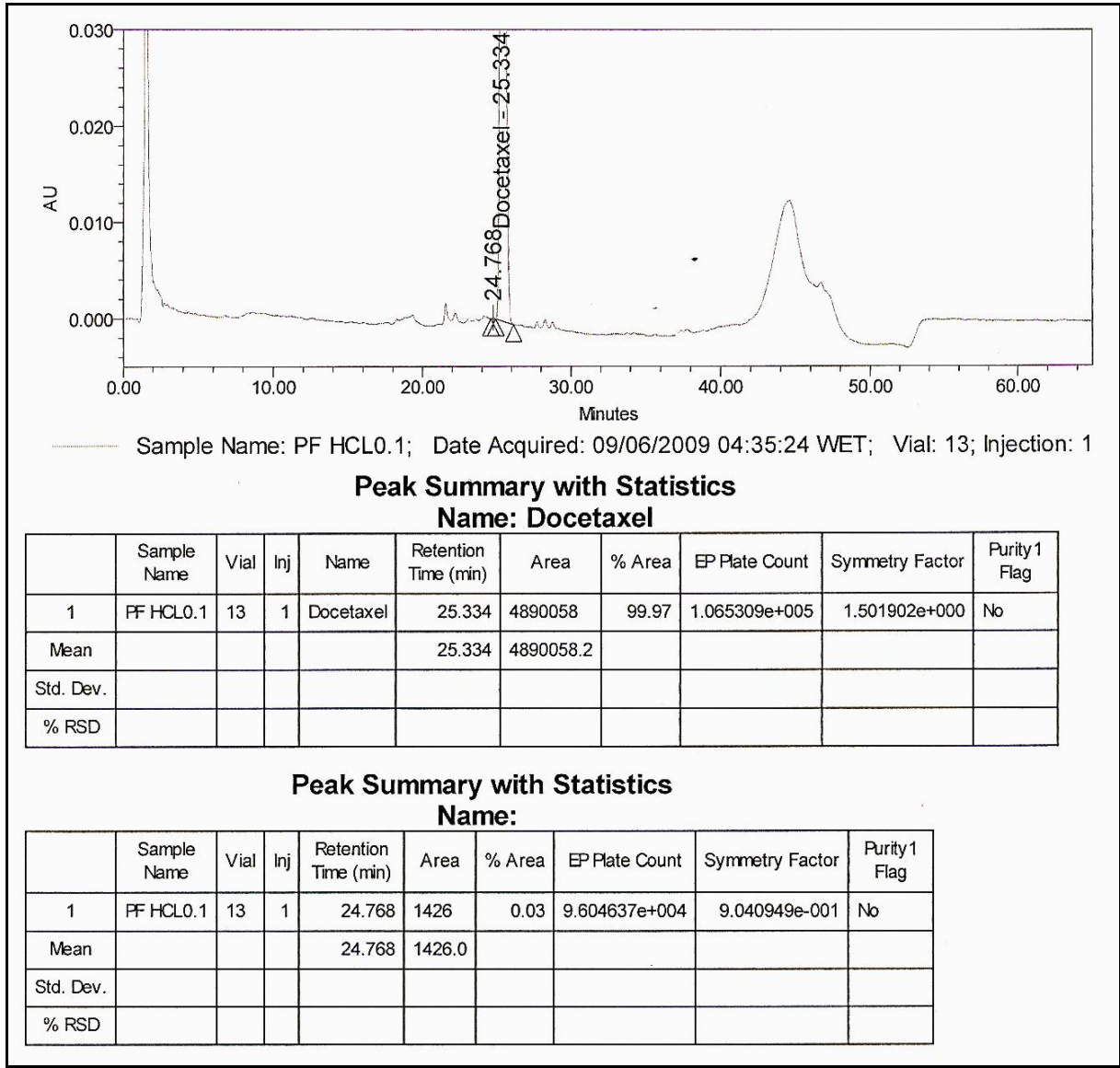
**Peak Summary with Statistics**  
Name: Docetaxel

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Purity1 Flag
1	PFNaOH0.05N(0.6ml)	21	1	Docetaxel	25.332	5418074	97.49	1.344873e+005	1.401705e+000	No
Mean					25.332	5418073.9				
Std. Dev.										
% RSD										

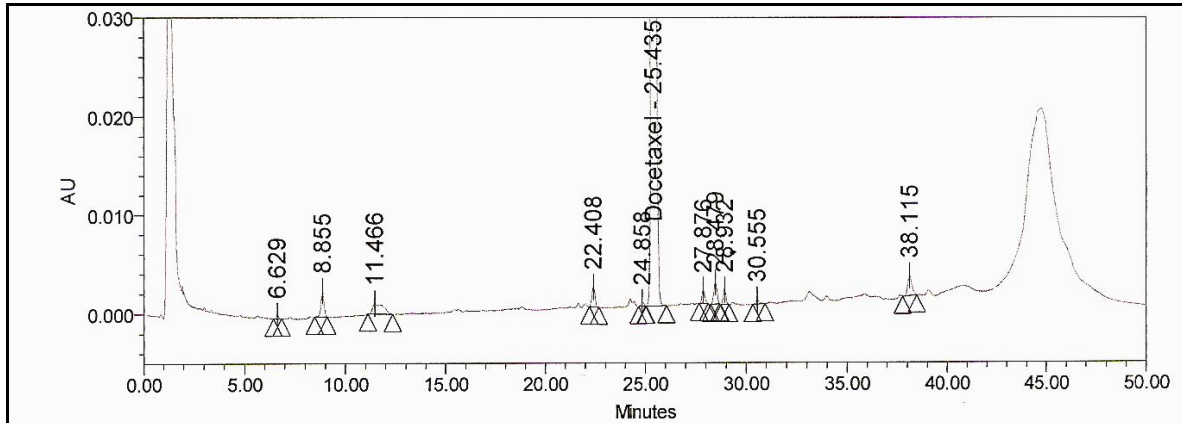
**Peak Summary with Statistics**  
Name:

	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Purity1 Flag
1	PFNaOH0.05N(0.6ml)	21	1	28.781	112255	2.02	1.523409e+005	1.628171e+000	No
2	PFNaOH0.05N(0.6ml)	21	1	6.756	5357	0.10	9.918275e+003	1.534927e+000	No
3	PFNaOH0.05N(0.6ml)	21	1	27.745	8046	0.14	1.063571e+005	1.272434e+000	No
4	PFNaOH0.05N(0.6ml)	21	1	24.748	1355	0.02	1.683328e+005	1.038566e+000	No
5	PFNaOH0.05N(0.6ml)	21	1	28.253	12729	0.23	1.122884e+005	1.079860e+000	No
Mean				23.257	27948.3				
Std. Dev.				9.356	47309.9				
% RSD				40.23	169.3				

**Chromatogramme 36** : Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai du produit fini dégradé par 0.6 ml de NaOH 0.05N



**Chromatogramme 37** : Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par 0.5 ml de HCl 0.1N



Sample Name: pfUV; Date Acquired: 22/05/2009 13:21:57 WET; Vial: 11; Injection: 1

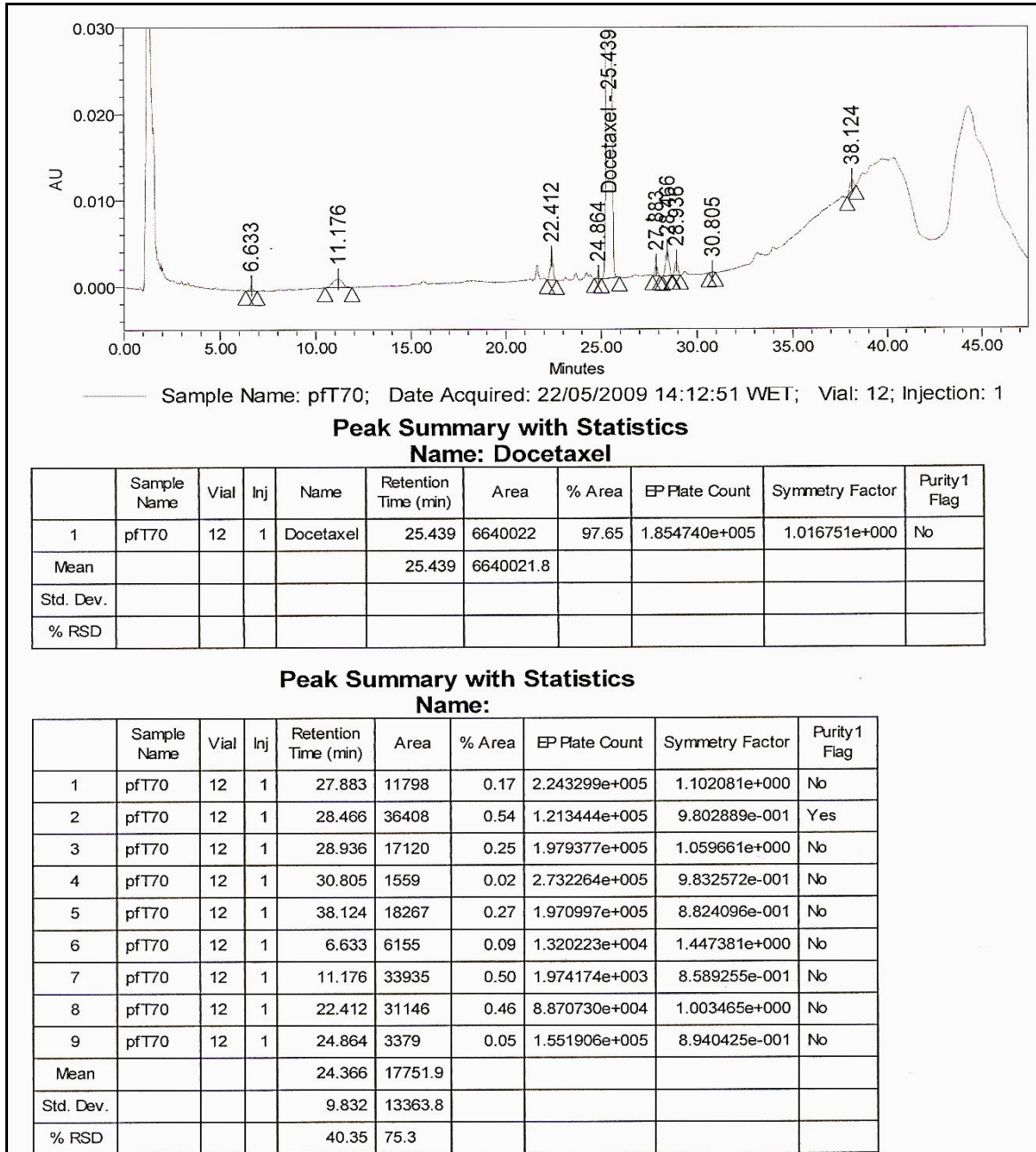
**Peak Summary with Statistics**  
Name: Docetaxel

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Purity1 Flag
1	pfUV	11	1	Docetaxel	25.435	7358659	97.56	1.859612e+005	1.023438e+000	No
	Mean				25.435	7358659.3				
	Std. Dev.									
	% RSD									

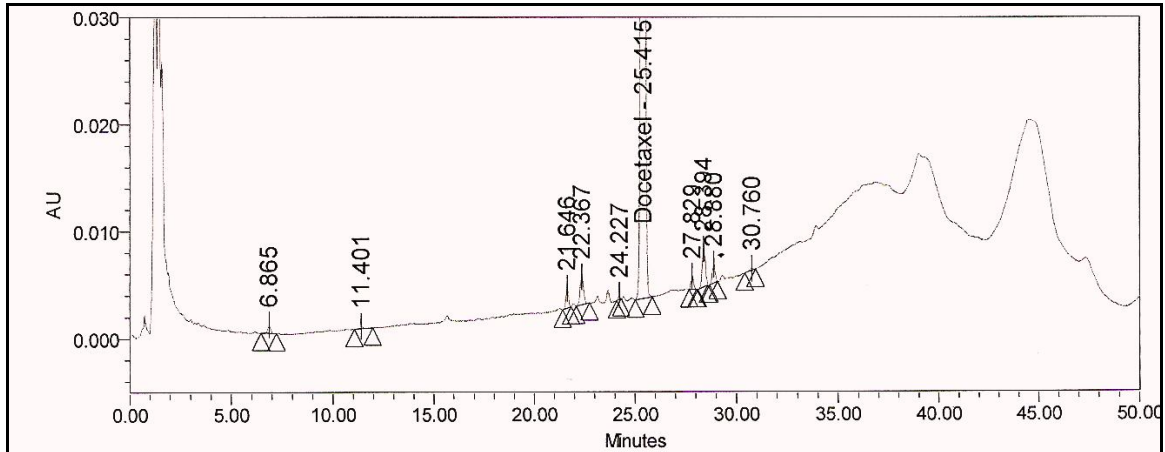
**Peak Summary with Statistics**  
Name:

	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Purity1 Flag
1	pfUV	11	1	8.855	27672	0.37	1.715805e+004	9.688794e-001	No
2	pfUV	11	1	6.629	2958	0.04	1.242513e+004	1.014718e+000	No
3	pfUV	11	1	11.466	38444	0.51	1.592147e+003	2.337326e+000	Yes
4	pfUV	11	1	28.479	25112	0.33	1.403954e+005	9.675864e-001	No
5	pfUV	11	1	30.555	5948	0.08	2.343846e+005	1.486294e+000	No
6	pfUV	11	1	38.115	29465	0.39	1.620405e+005	1.214066e+000	No
7	pfUV	11	1	28.932	14555	0.19	2.033804e+005	1.035524e+000	No
8	pfUV	11	1	27.876	13775	0.18	1.846544e+005	1.253879e+000	No
9	pfUV	11	1	22.408	22037	0.29	9.607138e+004	1.022127e+000	No
10	pfUV	11	1	24.858	4343	0.06	1.446390e+005	8.650321e-001	No
	Mean			22.817	18430.8				
	Std. Dev.			10.430	11998.6				
	% RSD			45.71	65.1				

**Chromatogramme 38:** Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par la lumière UV/Visible pendant 16h



**Chromatogramme 39:** Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par la chaleur pendant 4h



Sample Name: PF70; Date Acquired: 27/05/2009 08:30:57 WET; Vial: 7; Injection: 1

**Peak Summary with Statistics**  
Name: Docetaxel

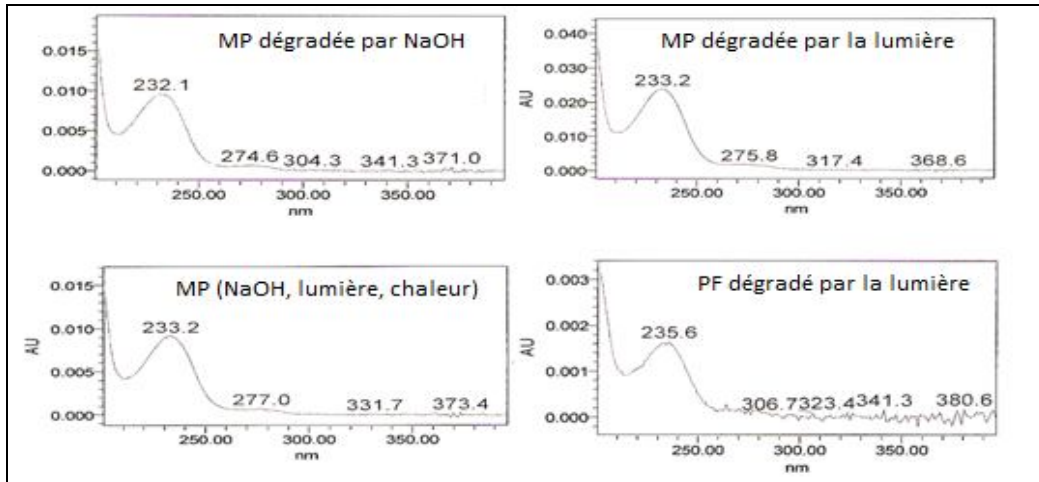
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Purity1 Flag
1	PF70	7	1	Docetaxel	25.415	6076540	97.90	1.775798e+005	1.006604e+000	No
	Mean				25.415	6076540.4				
	Std. Dev.									
	% RSD									

**Peak Summary with Statistics**  
Name:

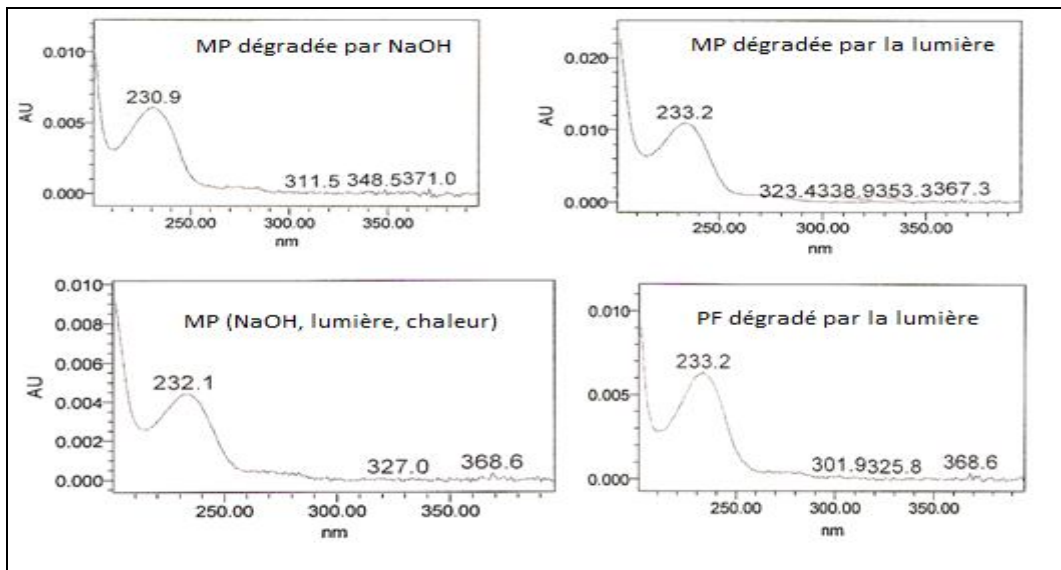
	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Purity1 Flag
1	PF70	7	1	6.865	7877	0.13	1.312621e+004	8.823514e-001	No
2	PF70	7	1	11.401	3002	0.05	3.347845e+004	6.635229e-001	No
3	PF70	7	1	21.646	16288	0.26	1.386956e+005	8.991240e-001	No
4	PF70	7	1	28.394	38336	0.62	1.533896e+005	9.492601e-001	No
5	PF70	7	1	30.760	2744	0.04	1.302620e+005	6.298522e-001	No
6	PF70	7	1	28.880	17541	0.28	1.854210e+005	9.693931e-001	No
7	PF70	7	1	27.829	11109	0.18	2.214777e+005	1.164095e+000	No
8	PF70	7	1	22.367	30488	0.49	8.640365e+004	9.492416e-001	No
9	PF70	7	1	24.227	2712	0.04	2.715748e+005	8.758941e-001	No
	Mean			22.485	14455.5				
	Std. Dev.			8.242	12752.1				
	% RSD			36.65	88.2				

**Chromatogramme 40** : Résultat de l'analyse chromatographique de l'essai de la matière première dégradé par la chaleur pendant 6h

**5. Les spectres UV des produits de dégradation potentiels dans la matière première et le produit fini**



**Figure 4** : Spectre UV de l'impureté A ( $t_r=6$  à 9min)



**Figure 5** : Spectre UV de l'impureté B ( $t_r = 11$ min)

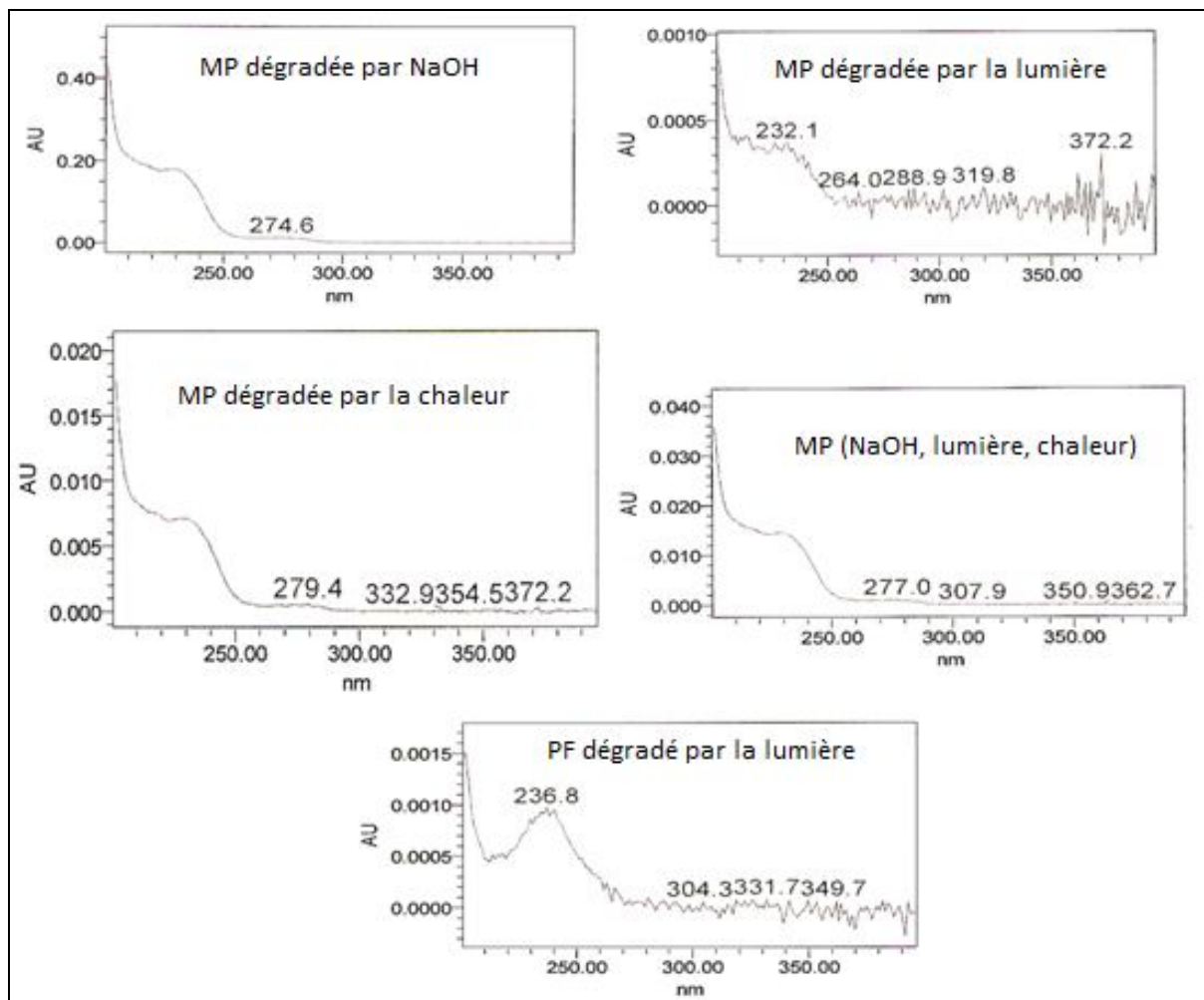


Figure 6 : Spectre UV de l'impureté C ( $t_r=28\text{min}$ )

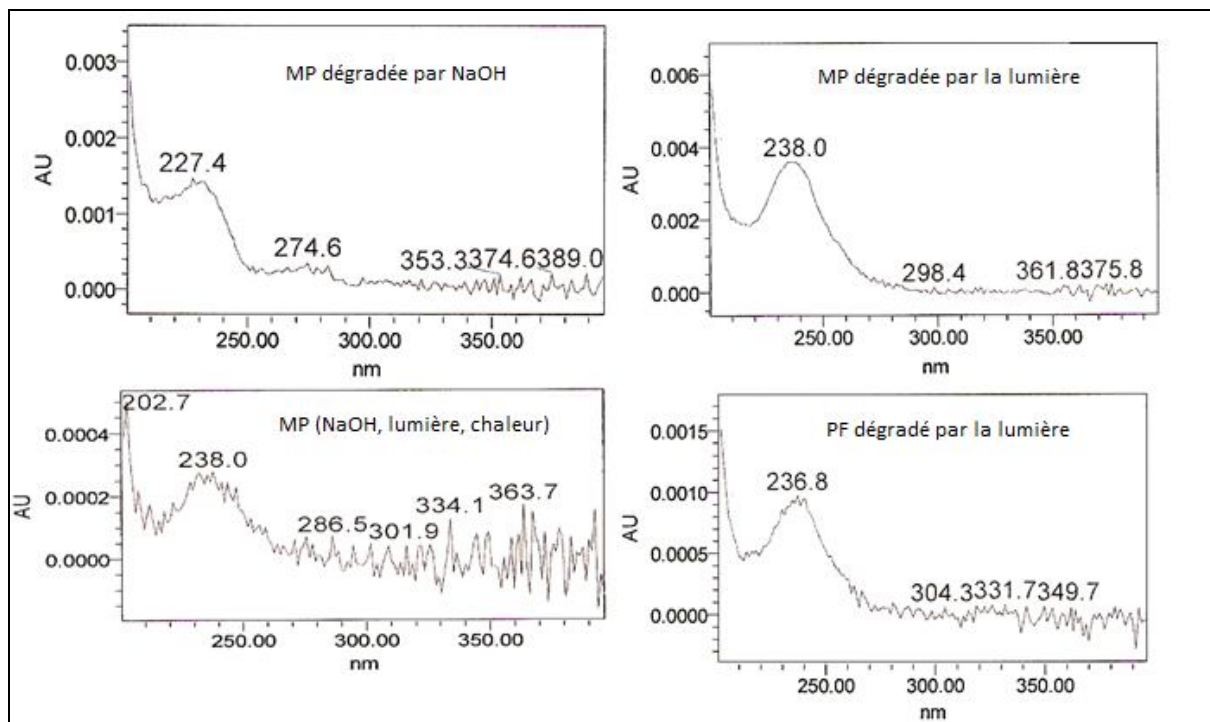


Figure 7 : Spectre UV de l'impureté D ( $t_r=30\text{min}$ )

### **III. Développement et pré-validation de la méthode d'analyse du Docetaxel**

#### **1. Développement de la méthode d'analyse**

En premier lieu, nous avons utilisé une méthode d'analyse chromatographique, extraite de la monographie de la pharmeuropa [9], pour l'analyse du Docetaxel (matière première). En utilisant cette méthode, nous avons constaté que la colonne chromatographique se détériore rapidement à cause de la température utilisée. Par ailleurs, la colonne exigée par la pharmeuropa n'était plus disponible dans le laboratoire. Nous avons donc changé la méthode d'analyse en modifiant la température, la colonne et les proportions du mode gradient pour pouvoir séparer les différents pics du chromatogramme en se retrouvant ainsi avec la deuxième méthode d'analyse.

Ensuite, nous avons remarqué la mauvaise résolution entre les pics des impuretés retrouvées dans le produit fini, ce qui nous a amené à mettre au point la méthode chromatographique finale, qui permet de séparer et de détecter un large éventail de produits de dégradation, il s'agit donc de la troisième méthode chromatographique précisée dans la partie « Méthodes ». Cette dernière nous a permis d'avoir une bonne résolution entre les pics du chromatogramme en donnant ainsi des pics fins.

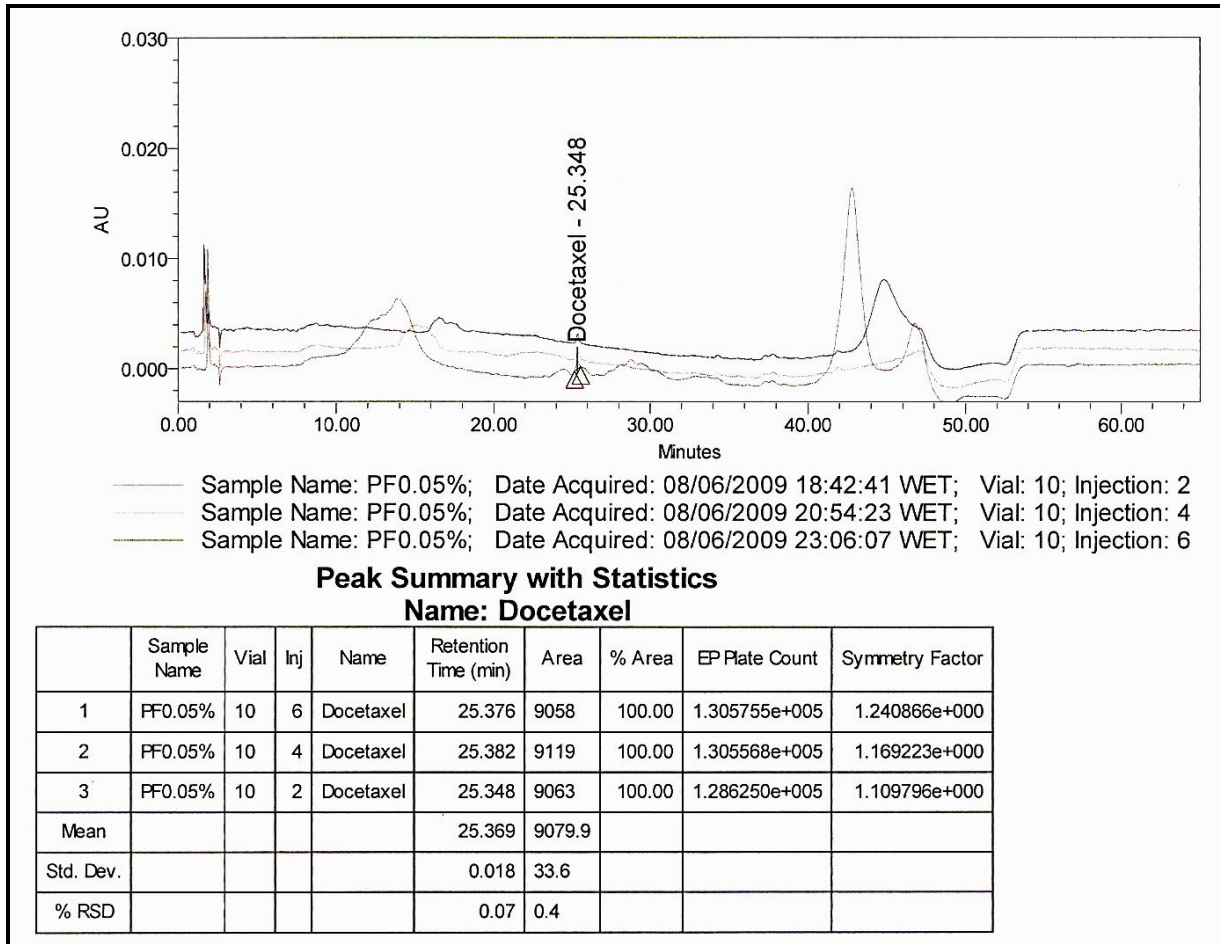
Les chromatogrammes des différents essais utilisés pour le développement de la méthode d'analyse sont ceux obtenus lors de l'étude préliminaire de la dégradation forcée et au cours du test de stress réalisé sur la matière première.

## **2. Pré-validation de la méthode d'analyse**

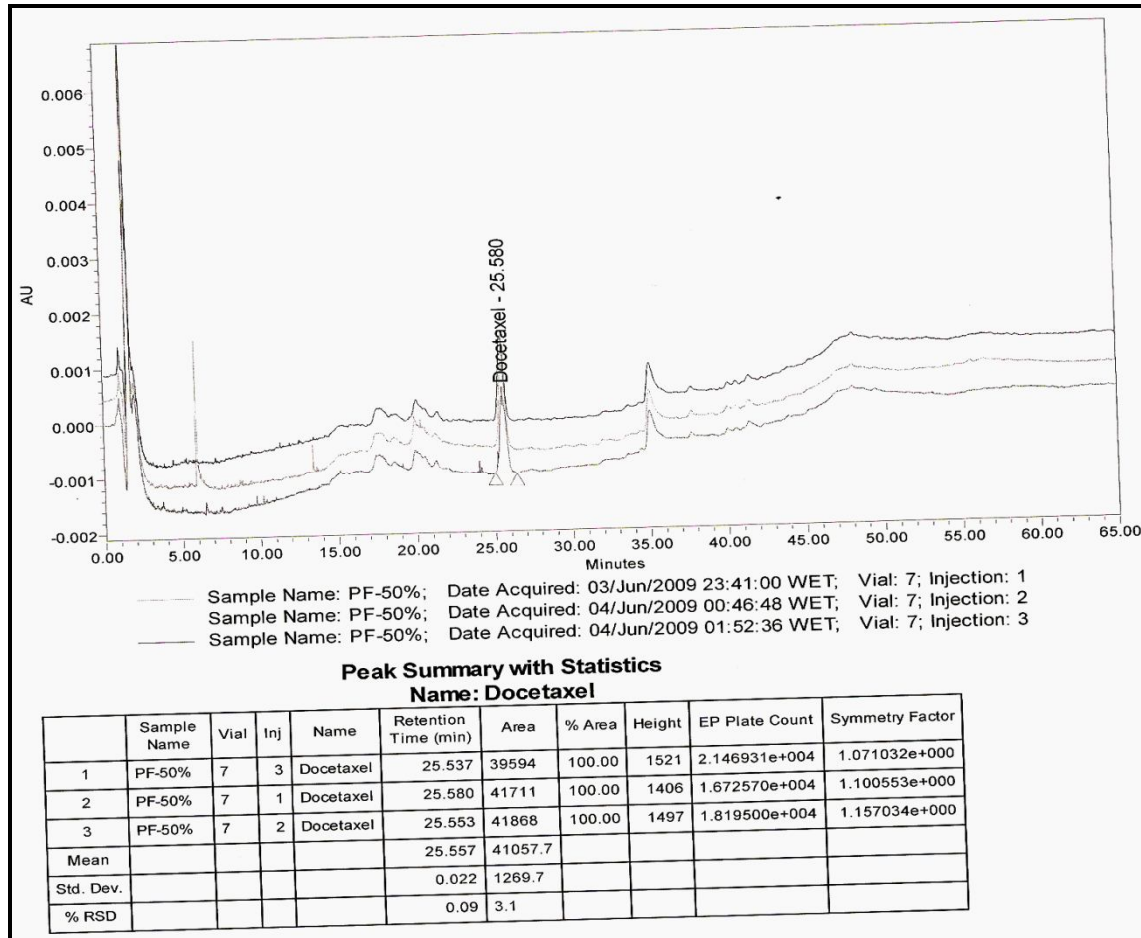
### **2.1. Spécificité :**

Voir les chromatogrammes N° 1, 4, 34 et la pureté des pics de Docetaxel mentionnée dedans.

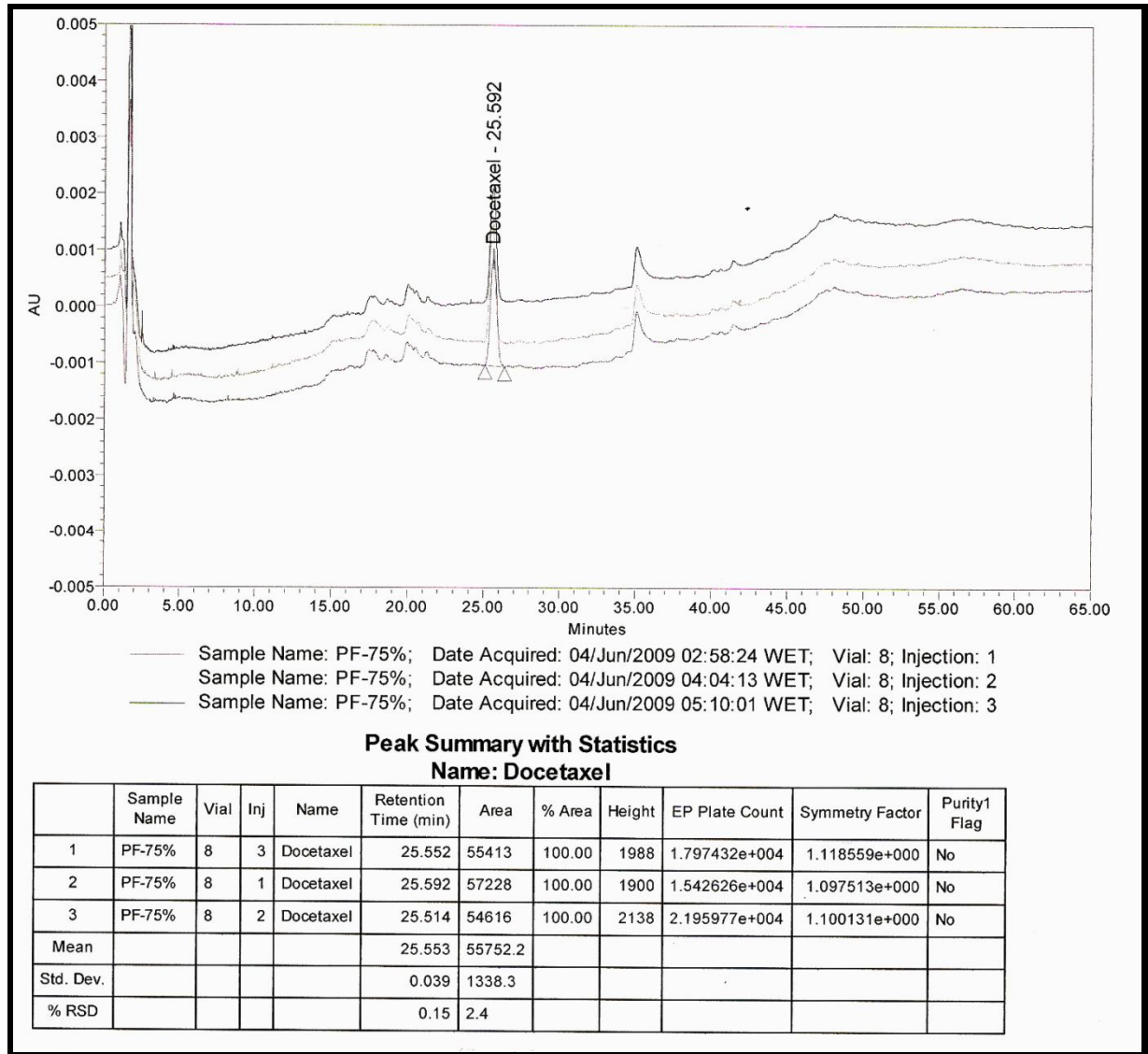
### **2.2. Linéarité :**



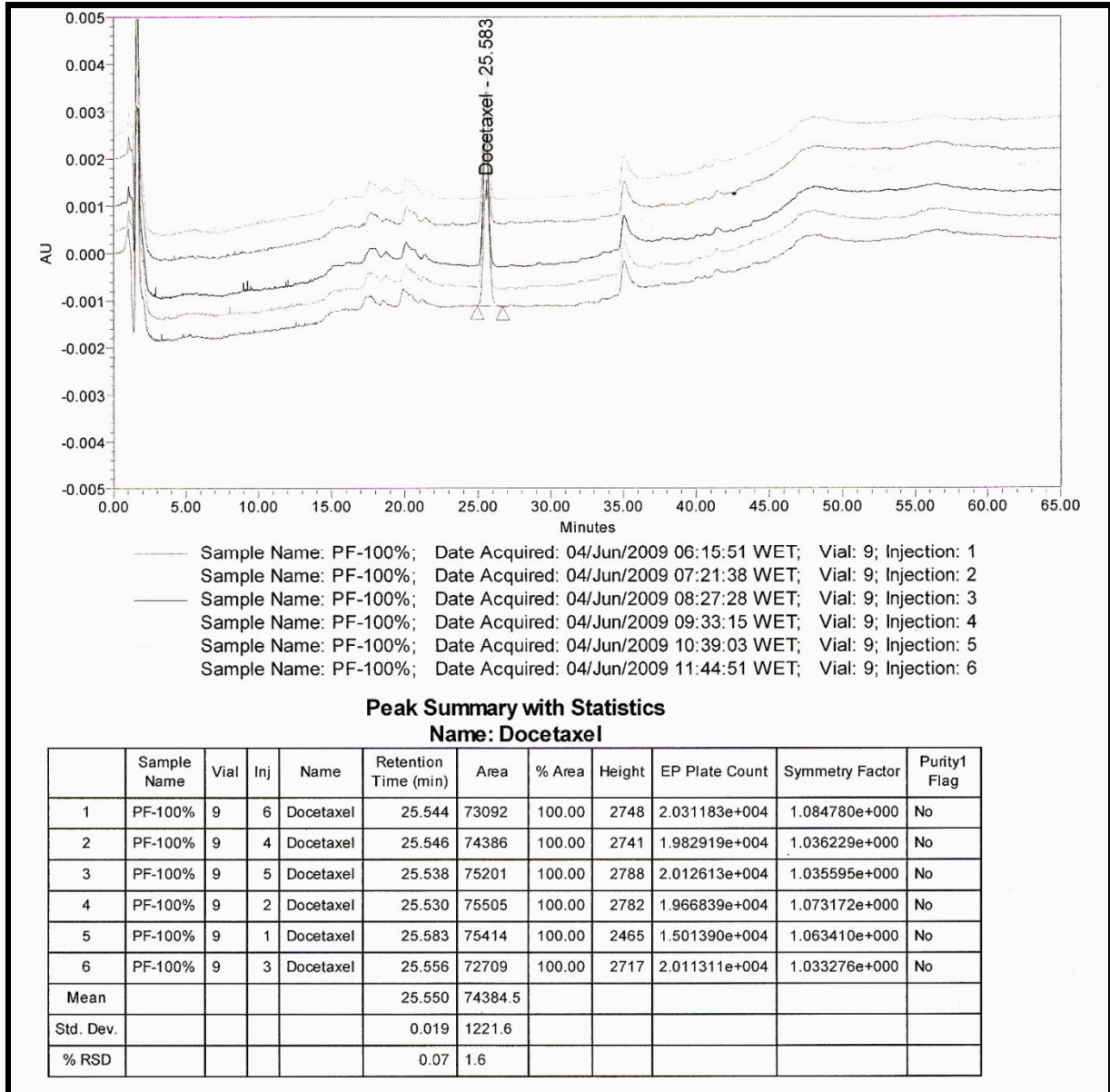
**Chromatogramme 41** : résultat de l'analyse chromatographique d'un essai du produit fini de concentration 0.05%



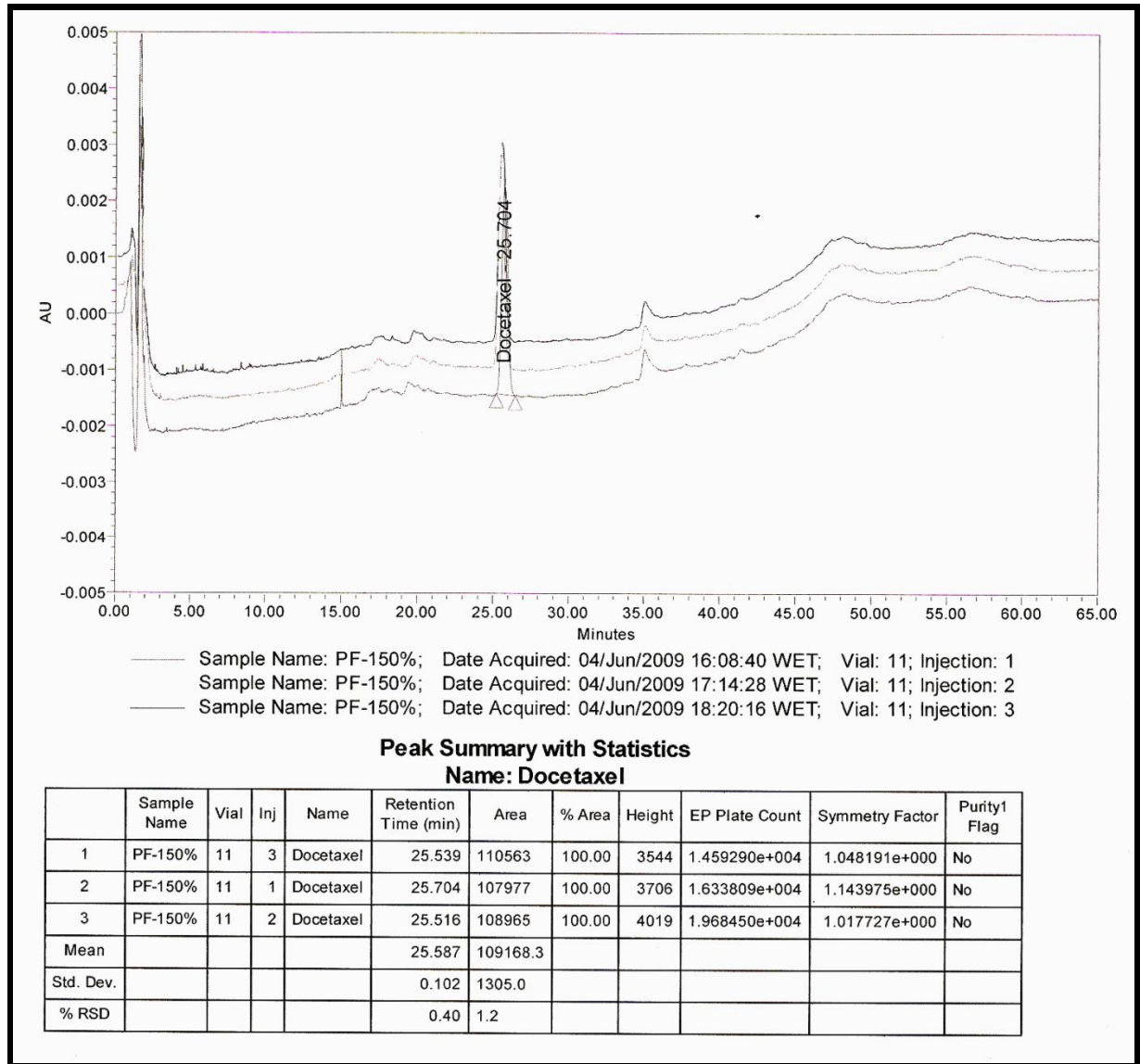
**Chromatogramme 42** : résultat de l'analyse chromatographique d'un essai du produit fini de concentration 5%



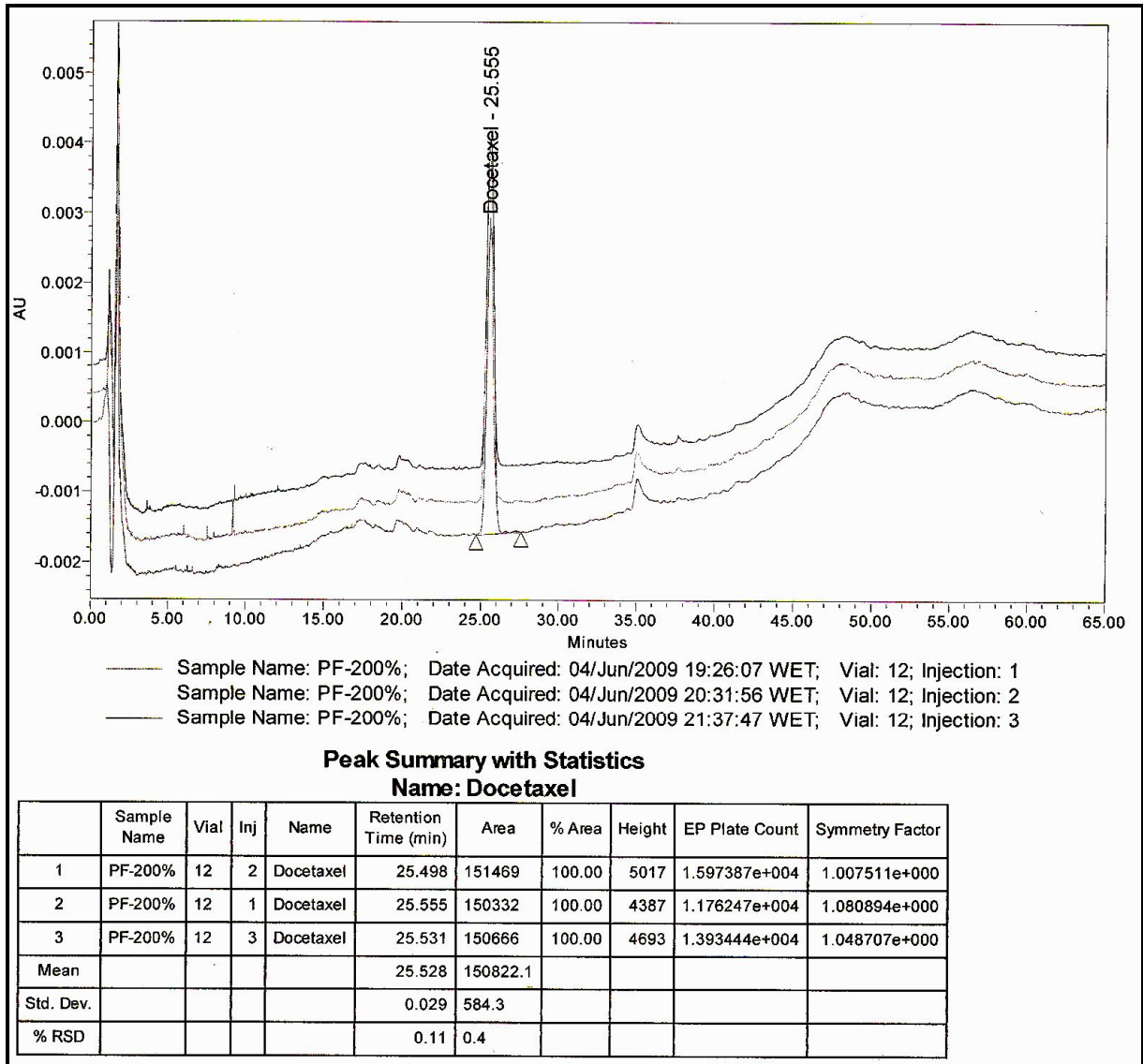
**Chromatogramme 43** : résultat de l'analyse chromatographique d'un essai du produit fini de concentration 7.5%



**Chromatogramme 44** : résultat de l'analyse chromatographique d'un essai du produit fini de concentration 1%



**Chromatogramme 45** : résultat de l'analyse chromatographique d'un essai du produit fini de concentration 1.5%



**Chromatogramme 46** : résultat de l'analyse chromatographique d'un essai du produit fini de concentration 2%

**Tableau XXI** : la variation des différentes concentrations du produit fini en fonction des aires correspondantes

concentration%	aire	valeur Théorique (Y)	Différence (Z)
0,05%	9063	7270,98	1792,02
0,05%	9058	7270,98	1787,02
0,05%	9119	7270,98	1848,02
0,50%	39594	39664,61	-70,61
0,50%	41711	39664,61	2046,39
0,50%	41868	39664,61	2203,39
0,75%	55413	57661,07	-2248,07
0,75%	57228	57661,07	-433,07
0,75%	54616	57661,07	-3045,07
1,00%	72709	75657,53	-2948,53
1,00%	73092	75657,53	-2565,53
1,00%	75201	75657,53	-456,53
1,50%	110563	111650,45	-1087,45
1,50%	107977	111650,45	-3673,45
1,50%	108965	111650,45	-2685,45
2,00%	150332	147643,36	2688,64
2,00%	151469	147643,36	3825,64
2,00%	150666	147643,36	3022,64

- La valeur théorique de l'aire pour la concentration 0.05% est :

$$Y = 71986 X + 3671$$

$$Y = 71986 * 0.05 + 3671$$

$$Y = 7270,98$$

- La différence entre la valeur théorique et la valeur expérimentale de l'aire est :

$$Z = 9063 - 7270,98$$

$$Z = 1792,02$$

**Tableau XXII** : la valeur de la moyenne, de l'écart type et de la variance calculée pour les différentes concentrations

CONCENTRATION	0.05%	0.5%	0.75%	1%	1.5%	2%
AIRE	9063	39594	55413	72709	110563	151098
	9058	41711	57228	73092	107977	151469
	9119	41868	54616	75201	108965	150658
MOYENNE	9080	41057,6667	55752,3333	73667,3333	109168,333	151075
ECART TYPE	33,8673884	1270,00092	1338,65467	1341,92859	1304,93576	405,988916
VARIANCE	1147	1612902,33	1791996,33	1800772,33	1702857,33	164827

- La valeur de la variance  $s^2$  pour chaque échantillon est inscrite sur le

**Tableau XXII** :

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

- La plus grande des variances :

$$S_{2\max} = 1800772.33$$

- La somme des variances :

$$\sum s_i^2 = 7075596.67$$

- Le rapport entre la plus grande valeur des variances et la somme des variances est défini par le test de Cochran :

$$C_{\text{test}} = \frac{s^2_{\max}}{\sum s_i^2}$$

$$C_{\text{test}} = 0.25326434$$

- On compare la valeur de  $C_{\text{test}}$  calculée avec  $C_{\text{table}}$  inscrit dans la table de Cochran (annexe 3) pour un risque  $\alpha$  généralement choisi à 5% et pour  $n=3$  et  $k=6$ .

$$C_{\text{tabulé}} = 0.6161$$

- Intercepte :

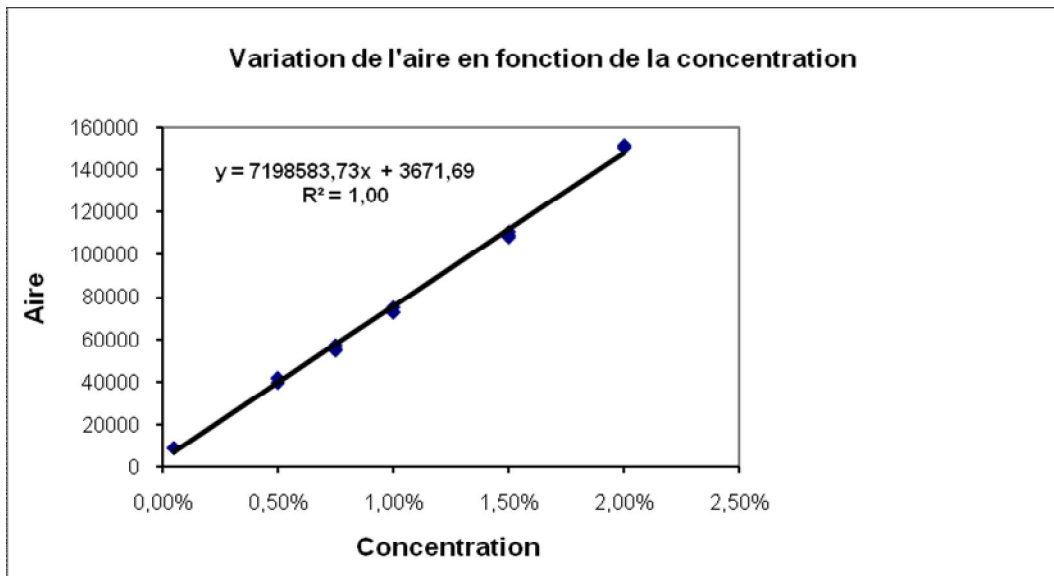
D'après le graphique de la

**Figure 8** :  $Y = 71986 X + 3671$

Et la moyenne des aires pour la concentration de 1% est de 73667.33

Donc :

- ✓ Intercepte =  $(3671 / 73667,33) * 100$
- ✓ Intercepte = 4.9%



**Figure 8** : courbe montrant la variation de l'aire en fonction de la concentration du Docetaxel dans le produit fini.

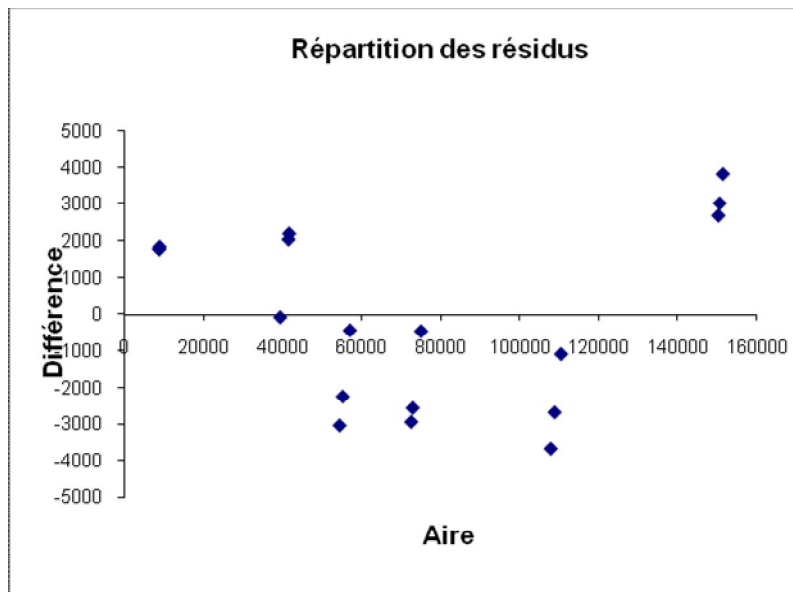
Le coefficient de corrélation  $r^2$  :

$$r = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

Avec :

$x_i$  : Indice théorique de la valeur individuelle

$y_i$  : Indice expérimental de la valeur individuelle



**Figure 9** : graphique présentant la répartition des résidus

Le graphique de la **Figure 9** nous permet de juger l'écart existant entre les mesures effectuées et celles calculées, c'est-à-dire la qualité de la différence entre l'expérience et le modèle mathématique. Dans notre cas les résidus semblent suivre une loi normale et centrée autour de la droite.

# ***Discussion***

---

Les résultats des études préliminaires indiquent que le Docetaxel est très instable dans les conditions basiques (NaOH 1N, 0.5 N et 0.1N) et les conditions acides (HCl 1N, 0.5N) en générant ainsi un taux de dégradation aux environs de 99%. Toutefois, l'utilisation de 0.2ml de NaOH à 0.01N ou de 0.2ml de HCl 0.1N a engendré des impuretés à un taux très faible, ce qui nous permet de déduire les conditions de stress optimales pour mener une étude objective de la dégradation forcée. On remarque également que 1.5ml ou 0.5ml du peroxyde d'hydrogène à 3% induit une dégradation dont le taux est toujours supérieur à 20%. La dégradation thermolytique et photolytique du Docetaxel dans les essais préliminaires a engendré un taux de dégradation qui dépasse les 30%.

L'analyse chromatographique de tous les échantillons, de la matière première et du produit fini (dégradé et non dégradé), révèle la présence d'une impureté à un temps de rétention au environ de 24 min, supposée être une impureté de synthèse, puisqu'elle apparaît également dans le standard fraîchement préparé.

Les échantillons utilisés lors des essais préliminaires ont servi au développement de la méthode d'analyse (préalablement décrite) qui sera utilisée dans l'étude finale du test de stress.

Lors du développement de la méthode d'analyse, nous avons constaté une grande différence entre les résultats obtenus selon la méthode analytique utilisée. En effet, d'après les chromatogrammes des essais préliminaires, nous remarquons que le pic du Docetaxel et de certaines impuretés ne sont pas bien séparés, et certains d'entre eux sont impurs selon les données de leur spectre UV, ce qui nous permet de conclure que la première et la deuxième méthode ne sont pas adéquates à cette analyse. Cependant, la troisième méthode, réalisée sur les essais de la dégradation forcée de la matière première et du produit fini du Docetaxel, donne des pics purs bien résolus entre eux. Cette étape de screening devra être suivie par une éventuelle validation de cette méthode choisie, ce qui est impossible dans notre cas vu la contrainte du temps et le manque du matériel.

Les résultats de l'étude de la dégradation forcée de la matière première montre que le Docetaxel est très sensible à la chaleur, à la lumière et à l'hydrolyse en milieu alcalin. En effet, l'exposition à ces conditions de stress permet d'engendrer à peu près quatre impuretés majeures A (trr A=0,26), B (trr B= 0,44), C (trr C=1.13), D (trr D=1.2) à des proportions différentes. Toutefois, la dégradation par la chaleur n'induit pas la formation des impuretés B et D mais génère une impureté dont le temps de rétention relatif est de 1.7.

La dégradation hydrolytique par la base est très intéressante puisqu'elle engendre tous les types d'impuretés préalablement citées, sauf celle qui présente un temps de rétention relatif de 1.7. Donc l'échantillon ainsi dégradé peut être considéré comme un système de conformité de Docetaxel, qui ne donne que les informations qualitatives sur les produits de dégradation du Docetaxel.

La dégradation hydrolytique par l'acide engendre des impuretés à un taux très bas, même si le taux de dégradation augmente avec le temps. Nous retrouvons dans le chromatogramme représentatif de cette dégradation, des impuretés qui existent même dans le standard mis en solution et conservé dans de bonnes conditions à une durée d'un mois.

La dégradation photolytique permet la formation d'une impureté qui sort à environ 8.85 min dont le taux s'élève en augmentant la durée d'exposition. Elle présente le même spectre UV que celle qui apparaît en 6.8 min dans l'essai dégradé par l'hydroxyde de sodium. Pour confirmer ces résultats, il faut avoir recours à la technique de la HPLC- MS, et/ou bien utiliser une colonne chirale qui permet de confirmer la présence des énantiomères.

La dégradation oxydative, par le peroxyde d'hydrogène, engendre un nombre restreint d'impuretés à des concentrations très basses même si le taux de dégradation augmente avec le temps. On trouve ainsi D (trr=1.2) et E (trr=1.09), et d'autres qui sont confondues au front de solvant. Cette dernière

information s'explique probablement par la présence des produits de dégradation très polaires, et/ou l'apparition des impuretés ne contenant pas des groupements chromophores, alors elles ne seront pas détectées par le détecteur UV/Visible

Nous avons trouvé une corrélation entre les différentes impuretés des essais exposés à chaque condition de stress, en se basant sur les spectres UV des substances apparentées trouvées, en effet ces quatre impuretés présentent séparément le même spectre UV dans les différentes conditions de stress. Ce résultat sera confirmé par une éventuelle analyse par la HPLC couplée à la spectrométrie de masse qui fournira l'information sur la masse moléculaire et la fragmentation de ces différentes impuretés, et par la RMN qui permet l'analyse structurale de ces molécules, en donnant des renseignements sur la nature chimique des groupements fonctionnels de chacune.

Les autres impuretés formées à des concentrations très basses ne sont pas prises en considération car certaines existent également dans le standard non dégradé et d'autres apparaissent à un taux très bas, pour confirmer cette dernière information, il est impératif de valider cette méthode d'analyse (qui nous a permis de détecter ces impuretés), pour évaluer la valeur de la limite d'exclusion de ses impuretés.

L'exposition de notre échantillon aux différentes conditions de stress (chaleur, lumière, base) pendant des durées de plus en plus grandes permet de constater l'accroissement du taux des impuretés préalablement générées et/ou la formation de nouvelles impuretés. Dans d'autres cas, nous observons la diminution du taux de certaines d'entre elles et/ou la disparition d'autres impuretés. Cela peut être expliqué par la survenue de dégradation secondaire.

C'est pour cette raison qu'il convient de prendre en considération uniquement les résultats de la dégradation forcée dont le taux ne dépasse pas 30% ou celle dont le taux de dégradation est supérieure à cette limite sans faire disparaître les produits de dégradation primaire et générer les produits de dégradation secondaire. Cette deuxième méthode est utilisée afin d'avoir une aire suffisante pour l'identification au spectre UV, et pour pouvoir générer les produits de dégradation majeurs au maximum, c'est le cas de la dégradation forcée hydrolytique par la base et photolytique de Docetaxel en tant que matière première.

Nous avons remarqué également que la durée d'exposition influence les résultats des études du test de stress. En effet, une longue durée d'exposition entraîne une augmentation du taux de dégradation, et la décomposition des impuretés potentielles en engendrant ainsi des produits de dégradation secondaires. Cet accroissement du taux de dégradation photolytique se fait

d'une manière exponentielle, c'est ce qui prouve la complexité du processus de la dégradation forcée.

Les résultats du test de la pureté chromatographique notés dans les chromatogrammes et donnés par le détecteur UV/Visible DAD confirment l'homogénéité et la pureté du pic de Docetaxel dans tous les échantillons soumis aux différentes conditions de stress.

D'après le résultat du standard et de l'essai non dégradé mis en solution pendant un mois dans de bonnes conditions, nous notons la présence des impuretés à un taux très faible, cela s'explique, peut être, par leur instabilité à l'état liquide, et leur dégradation au cours de la conservation, c'est pour cette raison que nous ne tenons pas compte de ces impuretés dans les résultats des essais dégradés.

Comme ce qui est démontré précédemment, les études de la dégradation forcée de Docetaxel révèlent quatre impuretés majeures A, B, C, D, dans les différentes conditions de stress, pour les isoler et les identifier il faut avoir recours à la méthode HPLC couplée à la spectrométrie de masse et la RMN.

Nous n'avons pas tenu compte des résultats des essais dégradés par l'acide chlorhydrique et le peroxyde d'hydrogène car ils sont inexploitable dans cette étude.

Nous n'avons pas calculé la valeur de la masse-balance car nous ne nous disposons pas de la concentration du Docetaxel et des impuretés dans chaque essai. Puisque la méthode d'analyse utilisée dans cette étude n'est pas encore validée

Pour récapituler les résultats de la dégradation forcée de Docetaxel (matière première), nous avons préparé un échantillon rassemblant les essais dégradés par la chaleur la lumière et la base, en retrouvant ainsi un chromatogramme récapitulatif du profil d'impureté (produits de dégradation) de Docetaxel. Ce chromatogramme est utilisé comme preuve de la sélectivité de notre méthode.

Pour étudier la stabilité du Docetaxel à long terme et générer ses produits de dégradation réels, nous avons conservé l'échantillon du produit fini à température ambiante et nous l'avons exposé à la lumière naturelle pendant 6 mois. Les résultats obtenus dans cet essai montrent la présence des produits de dégradation formés également dans l'étude de dégradation forcée, ce qui indique le rôle de l'étude du test de stress.

La dégradation du produit fini indique l'apparition des impuretés majeures formées lors de la dégradation de la matière première (trrA=0,26 /trr B= 0,44 /trr C=1.13/trr D=1.2) mais à des proportions différentes.

L'impureté à environ de 8.85 min apparaît également, à un taux très élevé, lors de la dégradation forcée, par la lumière, du produit fini.

Nous avons pu mettre une relation entre les résultats de la dégradation de la matière première et celle du produit fini pour confirmer cette constatation, il faut avoir recours à la technique de la HPLC-MS, et à la RMN.

Les paramètres qui nous permettrons de calculer AMBD (défaut Absolu Bde la Masse Balance) et RMBD (défaut Relatif de la Masse balance), ne sont pas disponibles, de ce fait, nous nous contentons juste de calculer le taux de dégradation, et le taux apparent des impuretés de chaque essai. La comparaison des valeurs ces deux derniers paramètres dans les essais exposés aux différentes conditions de stress montre qu'il existe toujours une perte de Docetaxel qui n'apparaît pas sous forme de produits de dégradation, cela peut être expliqué par :

- La rétention de certaines impuretés dans la colonne, de telle sorte qu'elles ne seront éluées qu'après le lavage de la colonne.
- L'absence des groupements chromophores, dans ses impuretés, responsable de l'absorption dans la lumière UV.
- La non-détection de ces impuretés par le détecteur UV/Visible,

Dans d'autre cas, les produits de dégradation peuvent être accidentellement exclus de l'échantillon testé en raison de leur volatilité ou leur adsorption sur le contenant.

Vu la contrainte de temps et la complexité de ce travail, nous n'avons pas pu révéler le vrai problème qui a engendré la perte du Docetaxel au cours de la dégradation forcée.

A travers ce travail, nous pouvons dire que le processus de la dégradation forcée est très délicat et il nécessite un temps suffisant pour le réussir. En effet, cette étude a été menée pendant 9 mois, avec un nombre d'injections et de chromatogrammes à analyser qui dépasse 1000.

D'après les chromatogrammes N° (1,45, 33), le pic du principe actif (Docetaxel) n'enchevauche avec aucune impureté. Ce qui prouve que notre méthode analytique est spécifique pour ce principe actif. Ce résultat est aussi confirmé par l'analyse de la pureté chromatographique par le détecteur UV/Visible à barrette diode.

D'après les résultats des calculs statistiques de la linéarité, nous remarquons que :

- La courbe représentative des valeurs du signal tracées en fonction de la concentration du Docetaxel dans le produit fini présente une pente réelle est significative :  $Y = 71986 X + 3671$

- Le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) entre les aires de nos échantillons est supérieur de 0.99.
- Le pourcentage de l'intercepte est de 4.9%, donc la courbe passe par le zéro.
- La valeur de Cochran calculée est inférieure à la valeur de Cochran tabulée, donc, la variance, entre les trois niveaux, est homogène et il n'y a pas de série à écarter.
- Une interprétation visuelle du graphique présentant la répartition des résidus, permet de dire que les résidus sont distribués d'une manière aléatoire.

Ces résultats montrent que notre méthode est linéaire pour les faibles concentrations (reste à prouver par des tests de la linéarité à forte concentration en perspective).

# ***Conclusion***

---

En guise de conclusion nous pouvons dire que l'étude de la dégradation forcée joue un rôle très important dans l'évaluation de la stabilité du Docetaxel, en passant par le développement d'une méthode analytique appropriée permettant de détecter les produits de dégradation générés par le processus préalablement cité.

Elle nous permet également de maîtriser la formulation du Docetaxel et de déterminer les conditions optimales de stockage puisqu'elle fournit des informations sur les conditions qui conduisent à la dégradation du Docetaxel, ce qui nous servira à la conception des contrôles appropriés et des conditions convenables durant la fabrication et le stockage.

Lors de la réalisation de notre étude qui consiste à développer une méthode d'analyse du Docetaxel en utilisant le processus de la dégradation forcée dans de différentes conditions de stress, nous avons pu remarquer une sensibilité notable du Docetaxel à la lumière et à la chaleur, d'où la nécessité de le conserver à l'abri de la lumière et d'éviter son exposition à une température élevée. Nous avons prouvé également sa sensibilité à la dégradation en milieu basique, par conséquent, il est impératif d'éviter les excipients basiques lors de la formulation.

La dégradation forcée du Docetaxel a engendré quatre impuretés majeures, dont les temps de rétention relatifs respectifs sont : A ( $t_{Rr} = 0,26$ ), B ( $t_{Rr} = 0,44$ ), C ( $t_{Rr} = 1,13$ ) et D ( $t_{Rr} = 1,2$ ). Certaines d'entre elles ont été formées également dans le test de stabilité à long terme lorsque le Docetaxel est conservé dans des conditions non appropriées. Ce qui confirme que la dégradation forcée engendre les produits de dégradation potentiel.

---

# **CONCLUSION GENERALE**

---

## Conclusion Générale

---

La présence des impuretés à un taux élevé peut affecter à la fois la stabilité, l'efficacité et l'innocuité du médicament. De ce fait vient l'intérêt du développement d'une méthode analytique permettant de détecter un large éventail de ces impuretés et appropriée à une substance donnée.

Le développement d'une méthode indicative de la stabilité du Docetaxel est un processus très important dans la mesure où aucune méthode d'analyse du Docetaxel n'a été inscrite dans la pharmacopée, et le système de conformité de cette molécule n'est pas disponible sur le marché. D'où vient le rôle de la dégradation forcée qui engendre un large éventail d'impuretés, ces dernières nécessitent d'être analysées et détectées par la méthode analytique ainsi développée, car elles sont particulièrement susceptibles d'apparaître lors d'une conservation dans des conditions non appropriées.

Cette étude était très délicate vu la complexité de la molécule traitée puisqu'il s'agit d'un anticancéreux nécessitant beaucoup de précautions lors de la manipulation, elle présente 11 Carbones asymétriques (C\*), ce qui reflète la présence d'un nombre élevé des énantiomères, elle a un poids moléculaire élevé qui atteint 861g/mol, ce qui entrave son analyse à la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG), et elle est très hygroscopique ce qui rend difficile sa manipulation.

Le processus de la dégradation forcée a également rendu difficile cette analyse puisqu'il ne présente pas un protocole général à suivre, et il change d'un laboratoire à un autre. Et il a nécessité plusieurs essais pour trouver les conditions optimales de stress, qui peuvent entraîner la dégradation à un taux compris entre 5 et 30%. Et sans générer les produits de dégradation secondaires.

Pour avoir plus d'information sur ces impuretés, il faut avoir recours à la HPLC couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS), la RMN ou bien la HPLC chirale, et/ou la CPG couplée à la MS, ce qui est prévu en perspective pour une complémentarité des résultats.

---

# ANNEXES

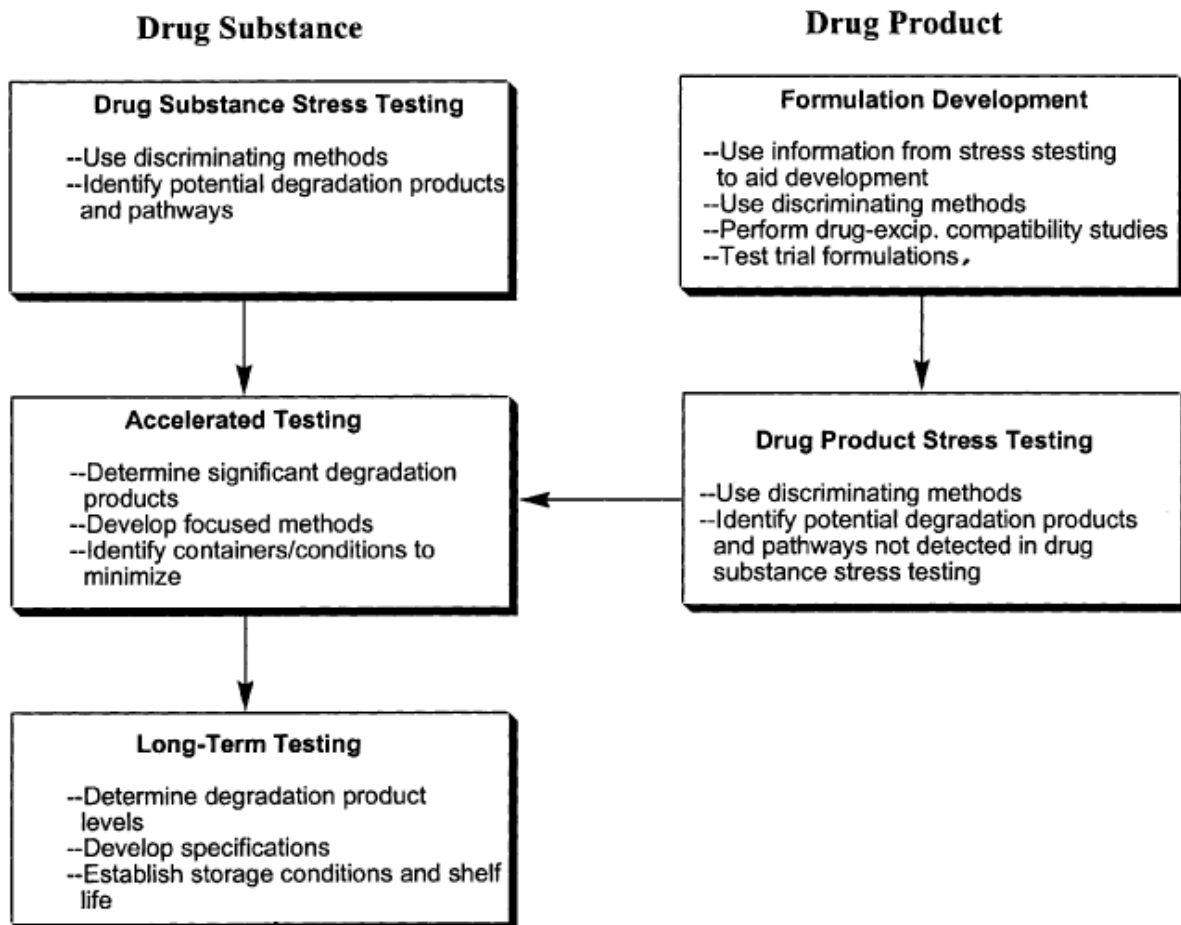
---

**Annexe I****Table 1** Selected Actinometers (Refs. 71–76)

Actinometer	Wavelength range (nm)	Analytical method	$\Phi$
Potassium ferrioxalate	250–450	UV absorbance	0.93–1.25
{Azobenzene (Actinochrome 2R)}	{230–460}	{UV absorbance, HPLC}	{ $\Phi_{\text{trans-cis}}$ 0.14 $\Phi_{\text{cis-trans}}$ 0.48}
Aberchrome 540	310–375	UV absorbance	0.209
Quinine hydrochloride	300–380	UV absorbance	Low
Pyridoxine hydrochloride	250–350	UV absorbance	—
2-Nitrocinnamaldehyde	300–400	UV absorbance	0.15
2-Nitrobenzaldehyde	290–400	Titration	0.5

## Annexe II

**Figure 2** Overall strategy for the prediction, identification, and control of stability-related issues.



**Annexe III****Table Critical values for the Cochran test for variance outliers**Degree of freedom  $\nu = n - 1$ .Level of significance  $\alpha = 0.05$ 

k	$V_x$													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	36	144	$\infty$
2	0.9985	0.9750	0.9392	0.9057	0.8772	0.8534	0.8332	0.8159	0.8010	0.7880	0.7341	0.6602	0.5813	0.5000
3	0.9669	0.8709	0.7977	0.7457	0.7071	0.6771	0.6530	0.6333	0.6167	0.6025	0.5466	0.4748	0.4031	0.3333
4	0.9065	0.7679	0.6841	0.6287	0.5895	0.5598	0.5365	0.5175	0.5017	0.4884	0.4366	0.3720	0.3093	0.2500
5	0.8412	0.6838	0.5981	0.5441	0.5065	0.4783	0.4564	0.4387	0.4241	0.4118	0.3645	0.3066	0.2513	0.2000
6	0.7808	0.6161	0.5321	0.4803	0.4447	0.4184	0.3980	0.3817	0.3682	0.3568	0.3135	0.2612	0.2119	0.1667
7	0.7271	0.5612	0.4800	0.4307	0.3974	0.3726	0.3535	0.3384	0.3259	0.3154	0.2756	0.2278	0.1833	0.1429
8	0.6798	0.5157	0.4377	0.3910	0.3595	0.3362	0.3185	0.3043	0.2926	0.2829	0.2462	0.2022	0.1616	0.1250
9	0.6385	0.4775	0.4027	0.3584	0.3286	0.3067	0.2901	0.2768	0.2659	0.2568	0.2226	0.1820	0.1446	0.1111
10	0.6020	0.4450	0.3733	0.3311	0.3029	0.2823	0.2666	0.2541	0.2439	0.2353	0.2032	0.1655	0.1308	0.1000
12	0.5410	0.3924	0.3264	0.2880	0.2624	0.2439	0.2299	0.2187	0.2098	0.2020	0.1737	0.1403	0.1100	0.0833
15	0.4709	0.3346	0.2758	0.2419	0.2195	0.2034	0.1911	0.1815	0.1736	0.1671	0.1429	0.1144	0.0889	0.0667
20	0.3894	0.2705	0.2205	0.1921	0.1735	0.1602	0.1501	0.1422	0.1357	0.1303	0.1108	0.0879	0.0675	0.0500
24	0.3434	0.2354	0.1907	0.1656	0.1493	0.1374	0.1286	0.1216	0.1160	0.1113	0.0942	0.0743	0.0567	0.0417
30	0.2929	0.1980	0.1593	0.1377	0.1237	0.1137	0.1061	0.1002	0.0958	0.0921	0.0771	0.0604	0.0457	0.0333
40	0.2370	0.1576	0.1259	0.1082	0.0968	0.0887	0.0827	0.0780	0.0745	0.0713	0.0595	0.0462	0.0347	0.0250
60	0.1737	0.1131	0.0895	0.0765	0.0682	0.0623	0.0583	0.0552	0.0520	0.0497	0.0411	0.0316	0.0234	0.0167
120	0.0998	0.0632	0.0495	0.0419	0.0371	0.0337	0.0312	0.0292	0.0279	0.0266	0.0218	0.0165	0.0120	0.0083
$\infty$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Kanji, Gopal K. **100 Statistical Tests**. London : SAGE Publication Ltd., 1993.

---

# Résumés

---

### Résumé

Le Docetaxel est une molécule active très utilisée en chimiothérapie anticancéreuse et approuvée dans plus de 90 pays pour traiter des pathologies cancéreuses différentes : cancers du sein, des poumons, de la prostate, de l'estomac et des voies aéro-digestives supérieures.

Dans le but de maîtriser les données de stabilité de cette molécule active, nous avons procédé à l'étude de sa dégradation forcée et au développement d'une méthode d'analyse indicatrice de sa stabilité

L'étude de la dégradation forcée a été réalisée en utilisant différentes conditions de stress à savoir la dégradation photolytique (lumière), thermolytique (chaleur), hydrolytique (en milieu basique) et oxydative (par le peroxyde d'hydrogène). Cette étude a permis de déterminer les conditions de stress optimales à l'analyse du Docetaxel, sans dépasser un taux de dégradation de 20% ou générer des produits de dégradation secondaires, et de générer les produits de dégradation potentiels qui peuvent se former dans les mauvaises conditions du stockage de cette molécule.

Le processus de la dégradation forcée nous a permis également de développer une méthode d'analyse HPLC sélective et sensible, servant au contrôle de la qualité du Docetaxel et ayant fait objet d'une pré-validation.

## ملخص

ضوسيتاكسيل هو جزيئة تستخدم على نطاق واسع في العلاج الكيميائي للسرطان والتي تمت الموافقة عليها في أكثر من 90 دولة مختلفة لعلاج سرطان الثدي والرئة والبروستات والمعدة والجهاز الهضمي العلوي.

من اجل السيطرة على بيانات الاستقرار في هذه الجزيئة ، أجرينا دراسة .  
التدهور القسري وتطوير طريقة لتحليل الإستقرار

تمت دراسة التدهور القسري باستخدام ظروف مختلفة من الضغط إنطلاقا من التحلل الضوئي (الضوء) ، مرورا بالحرارة ، والماء (وسط قاعدي) ، و وصولا للأكسدة (بيروكسيد الهيدروجين). هذه الدراسة مكنت أولا، من تحديد ظروف الضغط الأفضل لتحليل دوسيطاكسيل دون اجتياز نسبة تفكيك % 20 أو توليد مواد ناتجة عن التدهور القسري الثانوي، و ثانيا ، لتوليد منتجات محتملة للتدهور التي من الممكن أن تتشكل في ظروف سيئة لتخزين هذا الجزيئة.

إن عملية التدهور القسري مكنتنا كذلك من تطوير أسلوب تحليلي حساس وانتقائي، يستخدم لمراقبة نوعية ضوسيتاكسيل كما أنه خضع لموافقة قبلية.



## **Abstract**

Docetaxel is a molecule widely used in cancer chemotherapy and approved in over 90 countries to treat different cancer: breast, lung, prostate, stomach and digestive higher tract.

In order to control the data stability of this molecule, we carried out a study of the forced degradation and the development of stability-indicating HPLC assay method for docetaxel.

The study of forced degradation was performed using different conditions of stress as the photolytic (light), thermolytic (heat), hydrolytic (alkaline) and oxidative degradation (with hydrogen peroxide). This study has allowed firstly, to determine the optimal stress conditions for the analysis of docetaxel, with a rate of degradation that not exceed 20% and without generating secondary degradation products, and secondly, to generate potential degradation products which may emerge in poor storage conditions of this molecule.

The process of forced degradation allowed us also to develop a sensitive and selective analytical HPLC method, which is used for quality control of docetaxel and has been the subject of pre-validation.

---

# **Bibliographie**

---

- [1] <http://www.infosdumaroc.com/modules/news/article-print-1972.html>
- [2] <http://www.medix.free.fr/cours/metastases-osseuses-locomoteur.php>
- [3] <http://www.21cecpharm.com/dx/>
- [4] Garg MB, Ackland SP. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 748 (2000): 383–388.
- [5] Grozav AG, Hutson TE, Zhou X, Bukowski RM, Ganapathi R, XU Y. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004): 125–131.
- [6] Rao BM, Chakraborty A, Srinivasu MK, Devi ML, Kumarb PR, Chandrasekhar KB et al. A stability-indicating HPLC assay method for docetaxel. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (2006): 676–681.
- [7] Dieras V et al. essai de phase I/II d'escalade de dose du docetaxel (taxotere) chez les patients âgés de plus de 70 ans. 2002, 8-10.
- [8] E.seguin ; plantes médicinales à l'origine de grande médicaments d'aujourd'hui et de demain ; 2008
- [9] monographie de pharmeuropa, docetaxel trihydrate, vol.20, N°.2, APRIL 2008
- [10] [www.sanofi-aventis.ca/products/fr/taxotere.pdf](http://www.sanofi-aventis.ca/products/fr/taxotere.pdf)
- [11] VIDAL 2008, monographie TAXOTERE® Docetaxel
- [12] International Agency For Research on Cancer. Monographs on the Évaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Overall Évaluation of

- Carcinogenicity : An Updating of IARC Monographs. 13 april 1999 ; Volumes 1 to 42. Supplement 7.
- [13] International Agency For Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 9 june 2000 ; Vol 76.
- [14] pierre E Wallemacq, A Capron, R Vanbinst, . Boeckmans, J.Gillard, B.Favier La méthodologie et les résultats du programme ACPP l'American Journal of Health-System Pharmacy (AJHP) 2006.
- [15] T. Hinrichs D-Elmshorn 10-point-handling-instructions: The application of emergency and cleanup sets of spilt cytostatics ; BERNER INTERNATIONAL GMBH ; 2006, 1-18
- [16] guidelines for working safery with carcinogens, occupational health & safety unit (OH&S) , 2004. 1-32
- [17] R. Ahmamouch, Y .Ramli, contrôle qualité des produits cytotoxiques, 2008, 1-5
- [18] C.Ellie, V.Zanzi. Etudes de dégradation forcée au cours du développement pharmaceutique. *STP pharma pratique* 2007 ; 17(2) : p 89-99.
- [19] Carstensen JT, Swarbrick J, Drug Stability Principles and Practices. 1995, 2<sup>ème</sup> Edition: 127 – 156.
- [20] Kennon L. Use of kinetic methods in storage stability studies on drugs and pharmaceuticals. *Pharm sci* .1964; 53(7):815–818.
- [21] Yang WH, Roy SB. Projection of tentative expiry date from one-point accelerated stability testing. *Drug Dev Ind Pharm* 1980 ; 6(6) : 591–604.
- [22] Witthaus G, Breimer DD, Speiser P. Accelerated Storage Tests: Predictive Value, Topics in Pharmaceutical Sciences. Elsevier, North-Holland Biomedical Press, 1981 : 275–290.
- [23] Bakshi M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. *Pharma Technol*, 2000; 1–14

- [24] Boccardi G, Deleuze C, Gachon M, Palmisano G, Vergnaud JP. Autoxidation of drugs : prediction of degradation impurities from results of reaction with radical chain initiators. *J Pharm Sci* 1992; 81(2):183–185.
- [25] Weiser WE. *Developing analytical methods for stability testing. Pharma Technol* 1998:20–29.
- [26] Singh S, Bakshi M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. *Pharma Technol*. 2000, 1–14.
- [27] Alsante KM, Friedmann RC, Hatajik TD, Lohr LL, Sharp TR, Snyder KD, Szczesny EJ. Degradation and impurity analysis for pharmaceutical drug candidates. Academic Press, 2001: 85–172.
- [28] Reynolds DW, Facchine KL, Mullaney JF, Alsante KM, Hatajik TD, Motto MG. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. *Pharma Technol*. 2002; 26(2): 48–54.
- [29] Steven W. Baertschi. *Pharmaceutical Stress Testing Predicting Drug Degradation*. Taylor & Francis Group. 2005, 1-469
- [30] C.Ellie.V.Zanzi. Etudes de dégradation forcée au cours du développement pharmaceutique. *STP pharma pratique* 2007 ; 17(2) : p 89-99.
- [31] Ahuja S, Alsante KM, eds. *Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals, Separation Science and Technology*. Academic Press, Vol (5) 2003.361-391.
- [32] [http://fr.wikipedia.org/wiki/Loi\\_d'Arrhenius](http://fr.wikipedia.org/wiki/Loi_d'Arrhenius)
- [33] Waterman KC, Adami RC, Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *Int J pharm* 2005; 293: 101–125.
- [34] [ICH Q1 A (R2)]. *Stability Testing of new Drug substances and Product*
- [35] [ICH Q1 A (R2)]. *Stability Testing of new Dosage forms*

- [36] Waterman KC, Adami RC, Antipas AS, Arenson DR, Carrier R, Hong J, Landis MS, Lombardo F, Shah JC, Shalaev E, Smith SW, Wang H. Hydrolysis in pharmaceutical formulations. *Pharm Dev Tech* 2002; 7(2): 113–146.
- [37] Alsante KM, Martin L, Baertschi SW. A stress testing benchmarking study. *Pharm Technol* ; 2003; 27(2):60–72.
- [38] Espinosa S, Bosch E, Roses M. Retention of ionizable compounds in high-performance liquid chromatography. IX. Modeling retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of pH and solvent composition with acetonitrile-water mobile phases. *J Chromatogr A* 2002; 947(1):47–58.
- [39] Hart/ Conia. Introduction à la chimie organique, 1993, 177-190
- [40] Turner JO. The acid-catalyzed decomposition of aliphatic hydroperoxides: reactions in the presence of alcohols. *Tetrahedron Lett.* 1971 ; 14:887–890
- [41] DW Reynolds et al. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. *Pharmaceutical technology*, February 2002.
- [42] <http://fr.wikipedia.org/wiki/radical>
- [43] Macfaul PA, Wayner DDM, Ingold KU. A radical account of “oxygenated Fenton chemistry”. *Acc Chem Res* 1998 ; 31:159–162.
- [44] ICH Topic Q1B. Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products 1998 CPMP/ICH/279/95.
- [45] Impurities in new Drug substances. International Conference on Harmonisation, ICH Q3A(R), 2003.
- [46] Impurities in new Drug Product. International Conference on Harmonisation, Q3B(R), 2003.

- 
- [47]** Kirschbaum JJ. Synergistic use of multiple assays and achievement of mass balance to validate analytical methods. *Trends Anal Chem* 1988; 7:16–20
- [48]** Snyder LR, Glajch JL, Kirkland JJ. *Practical HPLC Method Development*. New York: John Wiley and Sons, 1988.