

# **SOMMAIRE**

	<b>Pages</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>DIABETE DE TYPE 2 ET TRAITEMENT</b>	<b>3</b>
1. Généralités	3
2. Insulinosécrétion	4
3. Insulinorésistance	4
4. Physiopathologie du diabète de type 2	5
5. Traitements	6
5.1. Traitement non médicamenteux du diabète	6
5.1.1. Régime alimentaire	6
5.1.2. Activité physique	7
5.1.3. Surveillance et contrôle de la glycémie	7
5.1.4. Education thérapeutique	8
5.2. Traitement médicamenteux	8
5.2.1. Les insulinosécréteurs	8
5.2.2. Les médicaments de l'insulinorésistance	9
5.2.3. Les Inhibiteurs des Alphasglucosidases	11
5.2.4. L'insulinothérapie	11
5.3. La phytothérapie	11
<b>GENERALITES SUR LE GLIMEPIRIDE</b>	<b>13</b>
1. Formule chimique	13
2. Numéro d'identification	13
3. Aspect et solubilité	14
4. Pharmacodynamie du Glimépiride	14
4.1. Effets sur la libération d'insuline	14
4.2. Effets extrapancréatiques	14

4.3. Action générale	15
4.4. En association à un traitement par metformine	15
4.5. En association à l'insuline	15
5. Pharmacocinétique du Glimépiride	15
5.1. Absorption	15
5.2. Distribution	16
5.3. Biotransformation et élimination	16
6. Etude préclinique du Glimépiride	16
7. Effet de surdosage du Glimépiride chez l'humain	18
8. Effets indésirables du Glimépiride	19
<b>GENERALITES SUR LE GLIMEPIRIDE</b>	<b>20</b>
1. Historique sur les médicaments génériques	20
2. Définition	21
3. Types de génériques	23
3.1. Les génériques copie – copie ou intégraux	23
3.2. Les génériques essentiellement similaires	23
3.3. Les génériques plus ou assimilables	23
4. Dénomination des génériques	25
4.1. La DCI	25
4.2. La DCI liés au nom du producteur	25
4.3. Le nom de marque / fantaisie	25
4.4. Le nom de fantaisie suivi de « Gé »	25
5. Qualité, efficacité et sécurité des génériques	26
5.1. Qualité	26
5.2. Efficacité	27
5.3. Sécurité	30
6. AMM des génériques	30
7. Substitution des médicaments	31
8. La stabilité des médicaments génériques	32

<b>9. Les génériques en Algérie</b>	<b>32</b>
<b>MATERIEL &amp; METHODES</b>	<b>33</b>
<b>1. Matériel végétal</b>	<b>33</b>
<b>1.1. Présentation de l'espèce</b>	<b>33</b>
<b>1.2. Utilisation ethnopharmacologique</b>	<b>34</b>
<b>2. Produits pharmaceutiques</b>	<b>35</b>
<b>3. Animaux et conditions d'élevage</b>	<b>35</b>
<b>4. Etude physicochimique des produits pharmaceutiques</b>	<b>35</b>
<b>4.1. Etude physicochimique de la matière première</b>	<b>36</b>
<b>4.1.1. Aspect</b>	<b>36</b>
<b>4.1.2. Identification par Infrarouge</b>	<b>36</b>
<b>4.1.3. Identification et dosage du Glimépiride par HPLC</b>	<b>37</b>
<b>4.1.4. Teneur en eau</b>	<b>38</b>
<b>4.1.5. Cendres sulfuriques</b>	<b>39</b>
<b>4.2. Etude physicochimique des médicaments</b>	<b>39</b>
<b>4.2.1. Aspect du comprimé</b>	<b>40</b>
<b>4.2.2. Identification et quantification du Glimépiride</b>	<b>40</b>
<b>4.2.3. Essai de dissolution</b>	<b>41</b>
<b>4.2.4. Test de désintégration</b>	<b>43</b>
<b>4.2.5. L'uniformité de masse</b>	<b>43</b>
<b>4.2.6. La sécabilité</b>	<b>44</b>
<b>4.2.7. Contrôle qualité / conditionnement du produit fini</b>	<b>45</b>
<b>5. Screening chimique</b>	<b>45</b>
<b>5.1. Tests préliminaires sur l'infusé</b>	<b>45</b>
<b>5.1.1. Recherche des Tannins</b>	<b>45</b>
<b>5.1.2. Recherche des Saponosides</b>	<b>45</b>
<b>5.1.3. Recherche des Anthocyanes</b>	<b>46</b>
<b>5.1.4. Recherche des Leuco-anthocyanes</b>	<b>46</b>
<b>5.2. Tests préliminaires sur la poudre</b>	<b>46</b>
<b>5.2.1. Recherche des Alcaloïdes</b>	<b>46</b>

5.2.2. Recherche des Flavonoïdes	47
5.2.3. Recherche des Cardinolides	47
5.2.4. Recherche des Terpènes et Stérols	47
6. Etude biologique	47
6.1. Préparation de l'extrait de plante	47
6.2. Induction du diabète	48
6.3. Traitement des animaux	48
6.4. Suivi pendant la période du traitement	50
6.5. Sacrifice et prélèvements	50
6.5.1. Sacrifice des rats	50
6.5.2. Prélèvement sanguin	50
6.6. Dosage des paramètres biochimiques après sacrifice	50
6.6.1. Dosage de la Glycémie et HbA1c	50
6.6.2. Dosage des Lipides totaux	51
6.6.3. Dosage des Triglycérides	51
6.6.4. Dosage du Cholestérol total	51
6.6.5. Dosage des HDLc	52
6.6.6. Dosage des LDLc	52
6.6.7. Dosage des Protéines totales	52
6.6.8. Dosage des AST	52
6.6.9. Dosage des ALT	53
6.6.10. Dosage de l' $\alpha$ -amylase	53
6.6.11. Dosage de la lipase	53
6.6.12. Dosage de la créatinine	54
6.6.13. Dosage de l'Urée	54
6.6.14. Dosage de l'acide urique	54
6.7. Traitement statistique des résultats	55
<b>RESULTATS &amp; DISCUSSION</b>	<b>56</b>
1. Etude physicochimique	56
1.1. Etude physicochimique de la matière première	56



1.1.1. Aspect et solubilité	56
1.1.2. Identification par infrarouge	56
1.1.3. Dosage par <i>HPLC</i>	57
1.1.4. Teneur en eau	58
1.1.5. Les cendres sulfuriques	58
1.2. Etude physicochimique du produit fini	59
1.2.1. Aspect du comprimé	60
1.2.2. Dosage par <i>HPLC</i>	60
1.2.3. L'essai de la dissolution	63
1.2.4. Le temps de désintégration	63
1.2.5. L'uniformité de masse	63
1.2.6. Essai de sécabilité	66
1.2.7. Contrôle de l'étanchéité des blisters	69
2. Screening phytochimique	69
2.1. Test sur l'infusé	69
2.1.1. Recherche des Tanins	69
2.1.2. Recherche des Saponosides	70
2.1.3. Recherche des Anthocyanes	70
2.1.4. Recherche des Leuco-anthocyanes	71
2.2. Tests sur la poudre	71
2.2.1. Recherche des Alcaloïdes	71
2.2.2. Recherche des Flavonoïdes	71
2.2.3. Recherche des Cardinolides	72
2.2.4. Recherche des Terpènes et Stérols	72
3. Résultats de l'étude biologique	74
3.1. Evolution des poids corporels et des glycémies avant sacrifice	74
3.1.1. Poids corporels	74
3.1.2. Glycémies	75
3.2. Paramètres après sacrifice	76
3.2.1. Glycémie et HbA1c	76
3.2.2. Profile lipidique	78
3.2.3. Protéines totales	81
3.2.4. Activités enzymatiques	81

**CONCLUSION & PERSPECTIVES**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**ANNEXE 1 : Paramètres biochimiques**

**ANNEXE 2 : Publication & Communication**

# *INTRODUCTION*

### *INTRODUCTION*

Le diabète de type 2 est une maladie chronique très répandue, c'est l'un des principaux défis du 21<sup>ème</sup> siècle en termes de santé et de développement; Selon l'OMS, le diabète a atteint des niveaux critiques, chaque année, pas moins de quatre millions de personnes meurent du diabète, et quelque dix millions d'autres souffrent de handicaps et de complications potentiellement mortelles (**Mbanya, 2010**). L'objectif du traitement est de cibler un contrôle glycémique par le maintien d'une hémoglobine Glyquée (HbA1c) le plus proche possible des valeurs normales en évitant des hypoglycémies.

Beaucoup de familles d'antidiabétiques oraux sont utilisés contre cette maladie, dont l'Amarel est l'un de ces médicaments, cet antidiabétique est prescrit en une seule prise par jour et il est connu par son effet rapide et prolongé.

Le Glimépiride, molécule active de l'Amarel, est un sulfamide oral hypoglycémiant, qui agit par stimulation de la libération d'insuline au niveau des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans pancréatiques. La stimulation se fait par fermeture des canaux potassiques de la membrane de la cellule  $\beta$ , ce qui permet l'ouverture des canaux calciques et l'entrée du calcium dans la cellule, stimulant ainsi la sécrétion d'insuline. Le Glimépiride augmente également le nombre de transporteurs actifs du glucose, la sensibilité des tissus extrapancréatiques est alors accrue (adipocytes, myocytes) et la vitesse d'action du glucose ralentie. Enfin, il diminue la captation de l'insuline par le foie en inhibant la néoglucogenèse (**Davis, 2004**).

Malgré que les génériques d'un médicament (princeps ou molécule d'origine), soient considérés par la législation comme étant une spécialité qui a la même composition qualitative et quantitative en principes actifs, la même forme pharmaceutique et dont la bioéquivalence avec la spécialité de référence est démontrée par des études de biodisponibilité (**Claudot et al, 2007**).

L'efficacité de ces médicaments est toujours remise en cause, aussi bien par les médecins, que par les patients; cependant leur prescription ne cesse d'augmenter dans le monde (**Abelli, 1996**).

En plus, devant le coût élevé des médicaments, l'Algérie, comme tous les pays en voie de développement, a opté pour les médicaments génériques, en important ou en produisant ces médicaments, au lieu de médicaments princeps protégés par brevet dans les pays développés (**Chemtob-Conce, 2005**).

La présente étude vise à vérifier l'effet antidiabétique d'un produit générique du Glimépiride, produit par une industrie pharmaceutique nationale et commercialisé en Algérie et évaluer son efficacité à deux doses différentes, préconisées par la posologie, à savoir 2 et 4 mg/jour, comparé à son princeps l'Amarel.

Ceci, a pour objectif de confirmer l'effet supposé des génériques et de pouvoir lever le doute sur leur manque d'efficacité supposée par rapport au princeps; ça permettra aux médecins de prescrire et aux patients de consommer les génériques à la place des substances d'origines avec confiance et éviter des dépenses inutiles, ce qui permettra l'accès aux traitements pour les patients les plus démunis.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressé à entreprendre ce travail qui est subdivisé en deux parties :

- Une partie bibliographique ou sont présentés des rappels sur le diabète de type 2 et ses traitements, une généralité sur le glimépiride, la molécule antidiabétique étudiée et une idée claire sur les génériques.
- Une partie pratique comprenant : une étude physicochimique des deux médicaments princeps et générique, un screening phytochimique sur la plante utilisée en combinaison de traitement et la réalisation d'une étude biologique sur des rats Wistar dont on a effectué un suivi des poids corporels et des glycémies pendant la période de traitement; une évaluation des paramètres biochimiques à la fin de l'expérimentation a été également réalisée.

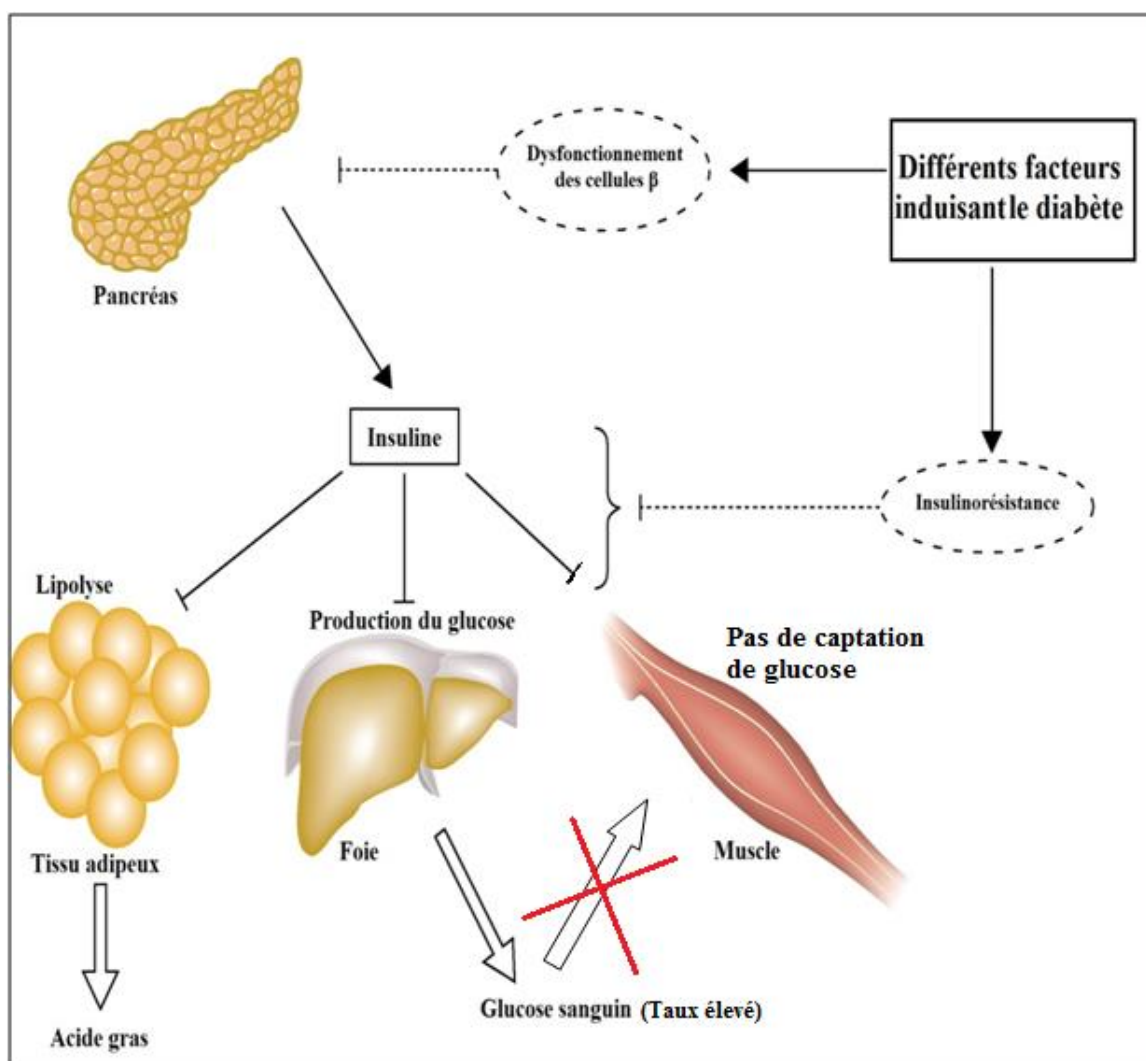
# *PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE*

*DIABÉTÉ DE*  
*TYPE 2 ET*  
*TRAITEMENTS*

## DIABETE DE TYPE 2 ET TRAITEMENTS

### 1. Généralités

La glycémie à jeun pour un adulte sain est comprise entre 0,7 et 1,26 g/L. Le diabète se définit par une hyperglycémie à jeun  $\geq 1,26$  g/L ou 7 mM. L'hyperglycémie peut être due à un défaut d'action de l'insuline sur ses tissus cibles ou insulinodépendants, associé à un défaut de production de l'hormone, caractéristiques du diabète de type 2 (**Drouin et al. 1999**) (**Fig.1**).



**Fig.1 : Influence de l'insuline sur différents tissus (Stumvoll *et al*, 2005).**

La sécrétion de l'insuline par le pancréas réduit normalement la production de glucose par le foie, augmente l'absorption du glucose par le muscle squelettique, et inhibe la libération d'acides gras par le tissu adipeux. Les divers facteurs qui contribuent à la pathogenèse du diabète de type 2 affectent à la fois la sécrétion et/ou l'action de l'insuline.



Le diabète de type 2 ou (DNID), est une maladie chronique, incurable, mais peut être contrôlée efficacement par des traitements. C'est un ensemble de désordres métaboliques: glucidique, lipidique et protéique, liés à l'insuffisance de la production de l'insuline ou à une résistance anormale à cette hormone (insulinopénie ou insulinorésistance). Ce type de diabète débute, généralement après l'âge de 40 ans. Le mauvais traitement peut engendrer des complications telles que: les maladies cardiovasculaires, et les problèmes rénaux (Stumvoll M. *et al*, 2005).

### 2. Insulinosécrétion

La régulation des différents métabolismes est assurée par la sécrétion d'insuline. L'insuline est une hormone peptidique synthétisée par les cellules Bêta des îlots de Langerhans. L'incapacité de ces cellules à produire suffisamment l'insuline, entraîne un diabète de type 2. Au niveau des cellules cibles, cette hormone facilite la pénétration du glucose dans les cellules en augmentant la perméabilité de leur membrane via des récepteurs au glucose, par exemple GLUT 4. Au niveau du foie, elle stimule la glycogénogenèse. La capacité, plus ou moins grande, de l'insuline à favoriser l'utilisation du glucose par les tissus périphériques définit le degré de sensibilité à l'insuline (Rigalleau V. *et al*, 2007).

### 3. Insulinorésistance

L'insulinorésistance est un état pathologique dans lequel les cellules cibles ou insulinodépendantes ne répondent plus à des taux physiologiques d'insuline. L'insuline n'est donc plus capable de maintenir l'homéostasie glucidique et lipidique. Cette insulinorésistance est associée à de nombreuses maladies: l'obésité, le syndrome métabolique ; elle peut être causée par des facteurs génétiques et environnementaux tels que l'alimentation, l'activité physique, l'âge, le tabac et les médicaments (EGIR, 2002).

En présence d'insuline, la lipolyse est inhibée, le glucose remplace les acides gras comme substrat énergétique dans le muscle squelettique et le cœur. En revanche, chez des personnes insulino-résistantes ou obèses, la lipolyse est augmentée suite à un défaut d'action de l'insuline sur le tissu adipeux (Arner *et al*, 1987).

L'insulinorésistance se manifeste par un trouble dans la transmission du signal à l'insuline, au niveau de la transduction du pool de GLUT4 (De Fronzo *et al*, 2004) ou dans la transmission du signal après la liaison de l'insuline avec son récepteur (Zhu *et al*,

2004). En effet, l'expression de la protéine du récepteur à l'insuline n'est pas affectée chez les patients atteints d'un diabète de type 2, ni la liaison de l'insuline à son récepteur (Arner *et al*, 1987).

### 4. Physiopathologie du diabète de type 2

On peut définir 5 étapes dans la progression du diabète (Weir *et al*, 2004) :

La première étape est celle de la compensation. Pour pallier à l'insulinorésistance et conserver une glycémie stable, il va y avoir une augmentation de l'Insulinosécrétion en augmentant la masse des cellules  $\beta$  (augmentation du nombre et hypertrophie).

La deuxième étape est celle de l'adaptation. Les cellules  $\beta$  ne sont plus capables de compenser l'insulinorésistance, on observe donc une hyperglycémie. Durant cette phase le glucose ne parvient plus à stimuler la phase précoce de sécrétion d'insuline, celle-ci n'apparaît que 3 à 10 min après l'hyperglycémie (Curry *et al*, 1968).

La troisième étape est celle de la décompensation. Durant cette étape, l'insulinorésistance est trop importante et la glucotoxicité trop élevée pour que les cellules  $\beta$  sécrètent suffisamment d'insuline, l'hyperglycémie se renforce, augmentant ainsi la glucotoxicité.

L'étape quatre est ensuite une étape de décompensation stable, où la sécrétion d'insuline bien que faible évite la progression de l'acidocétose. L'acidocétose est la conséquence d'une carence en insuline, elle correspond à une élévation excessive de l'acidité du sang, due à une accumulation de corps cétoniques (substrats énergétiques produits par les cellules hépatiques en période de jeun prolongé ou de diabète).

On observe une perte de masse et de volume des cellules  $\beta$  pancréatiques d'environ 50% chez les diabétiques de type 2 par rapport aux sujets contrôles. Chez un individu sain, il existe un équilibre entre la disparition des cellules  $\beta$  par apoptose et leur néogenèse (Bonner-Weir, 2000). La diminution de volume observée dans les cas pathologiques d'obésité et de diabète de type 2 résulte donc d'une augmentation de l'apoptose (Butler *et al*, 2003).

L'étape 5 est celle de la décompensation sévère. La perte des cellules  $\beta$  est trop importante pour éviter l'acidocétose et la personne devient dépendante d'un apport externe d'insuline pour survivre (Bonner-Weir, 2000).

### 5. Traitements

La gestion du diabète de type 2 a pour objectif principal de normaliser la glycémie et l'Hb glyquée des patients afin d'assurer leur survie et de leur éviter les complications ou retarder leurs évolutions.

#### 5.1. Traitement non médicamenteux du diabète

La résistance à l'insuline joue un rôle fondamental dans la pathogenèse du diabète de type 2 et peut provoquer des complications cardiovasculaires indésirables. Les interventions thérapeutiques devraient d'abord viser à l'amélioration de la sensibilité des tissus à l'insuline. Cela implique souvent un régime hygiéno-diététique, une activité physique régulière et une perte de poids, ce qui réduit nettement le risque de progression de la tolérance au glucose à un diabète et peut améliorer de nombreux paramètres de risques cardiovasculaires (Tuomilheto *et al*, 2001; Stumvoll *et al*, 2005 ; Gallois *et al*, 2009).

##### 5.1.1. Régime alimentaire

Il fait partie du traitement du diabète de types 1 et 2. Des études ont montré que les régimes contenant des aliments à index glycémique bas ont plus d'effets bénéfiques que les aliments à index élevé sur l'insulinorésistance (Gallois *et al*, 2009). Ainsi, le régime contenant des glucides complexes qui sont des aliments satiétogènes apportent moins de calories que les aliments riches en graisses. Aussi, les aliments riches en vitamines, minéraux et fibres sont conseillés aux diabétiques. L'obtention d'un amaigrissement pour les diabétiques obèses est souvent difficile, mais indispensable, et peut suffire à normaliser les glycémies au début du diabète et passe par une modification des habitudes alimentaires, qui doivent être évaluées au départ grâce à une enquête alimentaire (Pan *et al*, 1997).

- **Réduction de l'apport calorique** : l'objectif est d'avoir un apport calorique (en particulier les lipides et les glucides à index glycémique élevé) qui doit être réduit de 20 à 30% (Look Ahead Research Group, 2013).

- **Répartition des prises alimentaires** : Le fractionnement de l'alimentation en trois prises permettant une meilleure répartition de l'apport calorique sur la journée est souvent intéressant. Les repas doivent être mixtes, l'association aux glucides de protides et de lipides rend le repas moins hyperglycémiant (Tuomilheto *et al*, 2001).

- **Répartition entre les différents nutriments:** elle doit s'approcher de la répartition normale: 50 - 55 % de glucides, 30 - 35% de lipides et 15% de protides. La ration glucidique de sécurité à maintenir est d'au moins 100 g de glucides par jour. La ration protidique minimale est de 0,7g/jour (**Purrello & Rabuazzo, 2000**).

### 5.1.2. Activité physique

Elle est fondamentale pour le bien être du diabétique. Elle aide à contrôler la glycémie en augmentant la consommation du glucose ; ce qui entraîne une baisse de la glycémie. Elle favorise le maintien d'un poids idéal ; elle améliore la qualité de vie et elle aide à empêcher le développement des complications diabétiques (**Tuomilhto *et al*, 2001**).

L'augmentation de l'activité physique quotidienne et la réduction de la sédentarité sont utiles au traitement du diabète. En l'absence de l'activité physique, le lit capillaire musculaire se réduit, gênant ainsi la diffusion d'insuline (**DPPRG, 2002**).

L'activité physique améliore aussi la dyslipidémie en augmentant les HDL et en diminuant les triglycérides. L'exercice physique doit être régulier, adapté, prescrit après une évaluation cardiovasculaire et représenter une certaine détente pour le patient. Il permet de conserver une bonne masse maigre au détriment de la mauvaise graisse (**Vergès, 1998 ; James, 2008**).

### 5.1.3. Surveillance de la glycémie

L'autosurveillance ou l'autocontrôle de la glycémie est un élément important dans la prise en charge quotidienne des diabétiques traités par des antihyperglycémifiants oraux (**FID, 2009**).

Elle permet le contrôle de la glycémie, et à long terme, éviter les complications du diabète. Elle est réalisée au moyen d'un lecteur glycémique et de bandelettes réactives adaptées à chaque lecteur après avoir prélevé une goutte de sang au bout du doigt. Cependant chez le diabétique de type 1, il est recommandé actuellement de faire en moyenne 4 glycémies par jour et pour le diabétique de type 2 un contrôle de l'hémoglobine glyquée est recommandé tous les 3 mois (**Welschen *et al*, 2005**). Dans tous les cas, les mesures de glycémie devraient comprendre des mesures préprandiales et postprandiales (2h après le repas).

### 5.1.4. Education thérapeutique

C'est un élément essentiel dans la prise en charge du diabétique de types 1 et 2, et c'est un processus continu qui fait partie des soins médicaux, l'impact de l'éducation du diabétique peut être évalué à différents niveaux : psychosocial, apparition de complications chroniques à long terme afin d'arriver à un équilibre entre sa vie et le contrôle optimal de sa maladie (**Tuomilheto *et al*, 2001; FID, 2009**).

Il est recommandé de proposer au patient, dès la découverte du diabète, une éducation thérapeutique en groupe (de préférence) ou individuelle par des professionnels ; médecins et/ou des paramédicaux (diététicienne, infirmière, éducateur médico-sportif, psychologue) (**Anonyme, 2007**).

### 5.2. Traitement médicamenteux

Le traitement du diabète non-insulinodépendant est indiqué lors de l'échec du contrôle de la glycémie par un suivi d'un régime alimentaire et de l'activité physique.

La prise en charge thérapeutique du diabète de type 2 doit être précoce; elle doit viser à normaliser la glycémie et à corriger l'ensemble des facteurs de risque cardiovasculaire amendables; elle doit être adaptée à chaque patient en étant modulée selon l'âge physiologique, les comorbidités, la sévérité et l'ancienneté du diabète; elle doit s'appuyer sur la participation active du patient (**Anonyme, 2007**). Il existe actuellement trois grandes familles d'antidiabétiques oraux: Les insulino-sécrétagogues, les médicaments de l'insulinorésistance et les inhibiteurs des alphaglucosidases.

#### 5.2.1. Les insulinosécréteurs

##### 5.2.1.1. Sulfamides hypoglycémiants

Ce sont parmi les antidiabétiques oraux les plus prescrits. Ils stimulent la sécrétion d'insuline, qu'elle soit retardée ou insuffisante, en se liant à un récepteur spécifique présent sur la membrane de la cellule  $\beta$  pancréatique, ils sont connus par une rapidité de réaction et un effet de longue durée (**Groop, 1992**).

Il existe plusieurs produits commercialisés appartenant à cette classe parmi lesquels le Carbutamide (Glucidoral) de la première génération; ainsi que ceux de la deuxième génération : le glibenclamide (Daonil), le Glipizide (Glibénèse), le Gliclazide (Diamicon) et le Glimépiride (Amarel) (**Faure, 2011b**).

Les sulfamides sont capables de normaliser ou diminuer l'hyperglycémie des diabétiques de type 2 avec ou sans surpoids (diminution de l'HbA1c de l'ordre de 1 à 1,5%) (**Faure, 2011b**).

### 5.2.1.2. Glinides / Méglitinides

Le représentant principal de cette classe est le répaglinide (NovoNorm). Deux autres sont commercialisés dans certains pays: le natéglinide (Starlix), et le mitiglinide (Glufast) (**Blicklé, 2011**).

Ce sont des insulinosécréteurs d'action plus rapide et de plus courte durée. Le pouvoir hypoglycémiant du répaglinide est inférieur à celui des sulfamides (diminution de l'HbA1c de l'ordre de 1%) (**Anonyme, 2007**).

Le contrôle de la glycémie postprandiale apparaît meilleur que son effet sur la glycémie à jeun. Ils stimulent la sécrétion d'insuline en fermant les canaux potassiques ATP-dépendants et dépolarise la membrane cellulaire, provoquant un influx des ions calciques extracellulaires, favorisant l'augmentation du calcium intracellulaire responsable de la stimulation de la sécrétion d'insuline. Ils se lient à un site récepteur distinct de celui des sulfonylurées (groupe des sulfamides), et ne pénètrent pas à l'intérieur de la cellule. (**Owens et al, 2000**). Les glinides n'induisent une libération significative d'insuline qu'en présence de glucose dans le milieu, ce qui n'est pas le cas pour les sulfonylurées, qui stimulent la sécrétion d'insuline indépendamment de la concentration du glucose (**Pernet, 2001**).

L'absorption digestive du répaglinide est rapide. La concentration maximale est atteinte dans l'heure qui suit sa prise. Il circule à 98% sous forme liée aux protéines. Il est très rapidement métabolisé au niveau hépatique et éliminé à 90% par voie biliaire (**Blicklé, 2011**).

## 5.2.2. Les médicaments de l'insulinorésistance

### 5.2.2.1. Les Biguanides

Ils agissent en luttant contre l'insulinorésistance. Contrairement aux sulfamides hypoglycémiants, les biguanides n'ont aucune action insulinosécrétrice.

Le plus prescrit est la metformine.

- **La metformine (Glucophage):** est un médicament anti-hyperglycémiant préconisé au début du traitement du diabète de type 2 dans le but de diminuer le taux de glucose sanguin (**Kirpichnikov *et al*, 2002**).

C'est un diméthyl-biguanide sensibilisateur de l'insuline principalement au niveau du foie et du muscle squelettique et rarement au niveau du tissu adipeux, il réduit de 9 à 30 % la production hépatique de glucose en agissant principalement sur la voie de la néoglucogenèse, il peut également augmenter l'utilisation périphérique du glucose à l'état basal et sous stimulation insulinique (**Kirpichnikov *et al*, 2002**).

La metformine est capable de normaliser ou de réduire l'hyperglycémie du diabétique de type 2 (diminution de l'HbA1c de l'ordre de 1 à 1,5%) sans entraîner de prise de poids, mais elle peut même contribuer à la perte de poids. Par contre, elle participe à la stabilité pondérale lorsqu'elle est associée à d'autres antidiabétiques qui sont responsable d'une prise de poids (y compris l'insulinothérapie) (**Anonyme, 2007**).

L'absorption intestinale de la metformine est incomplète, soit 70 à 80 % de la dose est ingérée. L'augmentation de l'utilisation du glucose périphérique est d'environ 20 à 30% après administration de la metformine. Ce médicament améliore le métabolisme lipidique et diminue la synthèse de l'inhibiteur de la fibrinolyse PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor -1). Son élimination est rapide et par voie urinaire (**Scarpello & Howlett, 2008**).

### 5.2.2.2. Les thiazolidinediones / Les glitazones

Les thiazolidinediones potentialisent l'action de l'insuline sans stimuler sa sécrétion. Elles ont fait preuve de leur effet hypoglycémiant en monothérapie (réduction de l'HbA1c de l'ordre de 1 %) (**Anonyme, 2007**).

Ce sont des ligands des PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma) au niveau du tissu adipeux et expriment leurs effets métaboliques par l'intermédiaire de ces récepteurs. Elles diminuent l'insulinorésistance au niveau du foie, du muscle squelettique et du tissu adipeux; c'est à ce dernier niveau qu'elles jouent leur rôle principal en stimulant la différenciation adipocytaire. Elles améliorent la sensibilité à l'insuline en favorisant l'utilisation musculaire du glucose et la réduction de sa production hépatique. (**Pégorier & Girard, 2004 ; Virally *et al*, 2007**).

Les molécules actives disponibles sont la rosiglitazone (Avandia), retirée du marché en 2010 dans quelques pays comme la France (**Faure, 2011a**), et la pioglitazine (Actos) qui reste commercialisée.

Elles affectent indirectement le métabolisme du glucose chez les patients diabétiques en réduisant les taux d'acides gras libres et en favorisant la sécrétion de l'adiponectine impliquée dans la sensibilité musculaire et hépatique à l'insuline. Elles sont métabolisées par le foie et leur élimination est par voies rénale et hépatique (**Virally et al, 2007**).

### 5.2.3. Les Inhibiteurs des alphaglucosidases

L'acarbose (pseudo-tetra-saccharide) et le miglitol (monosaccharide) sont les deux médicaments inhibiteurs des  $\alpha$ -glucosidases. Ces analogues structuraux des oligosaccharides alimentaires inhibent de façon compétitive et réversible les alphaglucosidases de l'intestin grêle (**Reuser & Wisselaar, 1994**). Ces médicaments ralentissent l'absorption intestinale des polysaccharides alimentaires ainsi que leur dégradation enzymatique en mono et disaccharides qui sont alors absorbés dans l'iléon (**Blicklé, 2011**).

Le pouvoir hypoglycémiant est de l'ordre de 0,5 à 1% d'HbA1c. Les inhibiteurs des alphaglucosidases sont essentiellement actifs sur l'hyperglycémie postprandiale. L'effet sur la glycémie à jeun est en revanche modeste. (**Anonyme, 2007**).

### 5.2.4. L'insulinothérapie

Elle est utilisée seule pour les diabétique de type 1, alors que pour le type 2, elle est associée aux antidiabétiques oraux. La mise à l'insuline du diabétique de type 2 se fait dans un contexte d'urgence immédiate ou à très court terme. Elle est indispensable lors de la survenue d'une cétose, d'un coma hyperosmolaire ou pendant la grossesse, si le contrôle glycémique n'est pas obtenu par les antidiabétiques oraux seuls. Les autres situations qui nécessitent l'insulinothérapie à court terme, sont souvent transitoire, exemples: les infections sévères, l'existence d'une neuropathie et/ou d'une artériopathie compliquée avec déséquilibre glycémique et les interventions chirurgicales. (**Brun et al, 1995**).

## 5.3. La phytothérapie

Les plantes médicinales ayant des propriétés hypoglycémiantes, sont employées pour le contrôle du diabète dans beaucoup de pays.



En effet, beaucoup d'études ont montré et confirmé l'activité hypoglycémique des extraits de plantes, ainsi que les mécanismes d'action de plusieurs groupements actifs naturels chez différents modèles animaux, ont été élucidés (**N'Guessan *et al*, 2008; Rammal *et al*, 2009 ; Yadav *et al*, 2010 ; Orhan *et al*, 2012**).

Les extraits de plantes sont utilisés seuls ou en association avec les médicaments hypoglycémisants ; des études ont rapporté que ces combinaisons de traitements semblent plus efficaces (**Yadav *et al*, 2010 ; Veeresham *et al*, 2012**).

*GENERALITES SUR  
LE GLIMEPIRIDE*

## GENERALITES SUR LE GLIMEPIRIDE

Le glimépiride (Glimepiridum, Glimepiride ou Glimépiride), est un agent hypoglycémiant du groupe Sulfamide et de la famille des Sulfonylurées ; c'est la substance active du médicament **Amarel**, un antidiabétique oral à effet insulinosécrétagogue utilisé dans le traitement diabète non insulino dépendant (type 2). Chez l'adulte, comme pour les autres antidiabétiques oraux, il est prescrit lorsque le régime alimentaire, l'exercice physique et la réduction pondérale seuls ne sont pas suffisants pour rétablir l'équilibre glycémique (**Draeger, 1995 ; Rosenstock et al, 1996**).

La posologie initiale de Glimepiride est de 1 mg par jour, soit 1 comprimé à 1 mg par jour. Elle dépend des résultats de la glycémie et de la glycosurie. Si le contrôle glycémique est satisfaisant, cette posologie peut être adoptée comme traitement d'entretien. Elle aller jusqu'à 6 mg et parfois 8 mg par jour (**VIDAL, 2010**).

### 1. Formule chimique

Selon la dénomination commune internationale (DCI), le glimepiride est le : **1-[ 4- [2-(3-Ethyl-4-méthyl-2-oxo-3-pyrroline-1-carboxamido)-éthyl]phényl] sulfonyl]-3-trans-(4-méthylcyclohexyl)urée**.

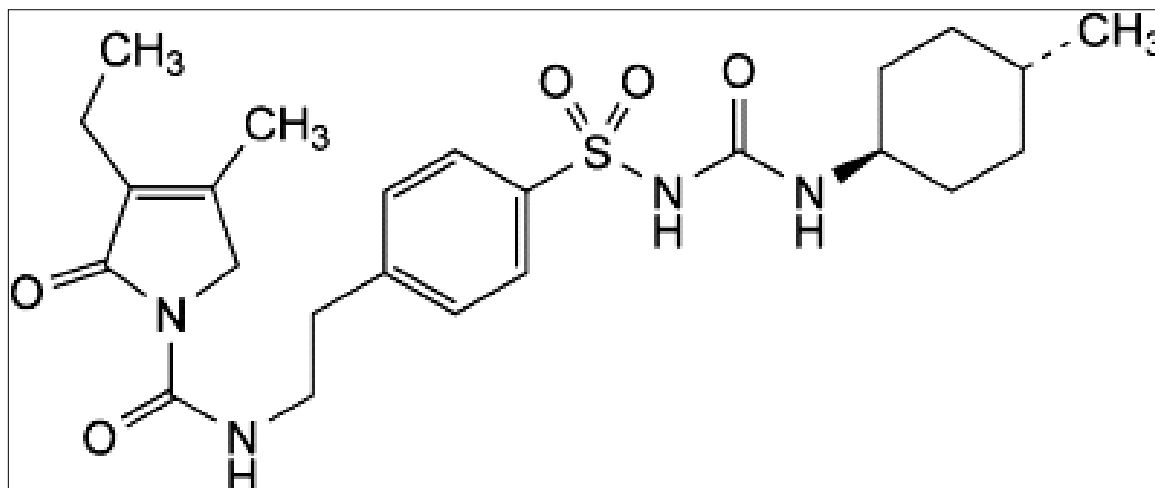


Fig.2 : Structure chimique du glimépiride (Ph. Eu., 2011)

### 2. Numéros d'identification

Le glimépiride est identifié par son numéro CAS ou CAS number : 93479-97-1. (C'est le numéro d'enregistrement unique de la substance glimépiride dans la base de données Chemical Abstract Service) (**Schollmeier, 1993**).

### 3. Aspect et Solubilité

C'est une poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans le diméthylformamide, peu soluble dans le chlorure de méthylène et très peu soluble dans le méthanol. Le glimépiride présente le phénomène du polymorphisme (**Ph.Eu, 2011**). Le polymorphisme est défini comme étant la possibilité qu'ont certaines molécules d'exister sous au moins deux structures cristallines distinctes (**Mc Crone, 1965**). Dans le domaine pharmaceutique, le polymorphisme concerne plus de 80% des molécules de principe actif (**Giron, 1994**).

### 4. Pharmacodynamie du Glimépiride

Le Glimépiride est un agent insulinosécrétagogue, comme les autres sulfonylurées, cet effet repose sur une augmentation de la réponse des cellules  $\beta$  pancréatiques au stimulus physiologique dû au glucose. De plus, comme d'autres sulfonylurées, il semble exercer d'importants effets extrapancréatiques (**Rosenstock et al, 1996**).

#### 4.1. Effets sur la libération d'insuline

Les sulfonylurées régulent la sécrétion d'insuline en fermant les canaux potassiques dépendant de l'ATP au niveau de la membrane de la cellule bêta. La fermeture de ces canaux potassiques induit une dépolarisation de la membrane, entraînant une augmentation de l'entrée de calcium dans la cellule par ouverture des canaux calciques. L'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire stimule la libération d'insuline par exocytose. Le glimépiride se lie à une protéine membranaire de la cellule bêta. Cependant, la protéine de liaison, associée aux canaux potassiques dépendants de l'ATP, est différente de celle des autres sulfonylurées (**Langtry & Balfour, 1998; Overkamp et al, 2002; Muller, 2014**). Le Glimépiride possède également une activité insulino-mimétique et une activité insulino-sensibilisatrice (**Neyrolles et al, 1998**).

#### 4.2. Effets extrapancréatiques

Les effets extrapancréatiques sont résumés à une amélioration de la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline. Le glimépiride augmente très rapidement le nombre de transporteurs actifs dans les membranes des cellules musculaires et adipeuses, ce qui stimule ainsi la captation du glucose (**Rosenstock et al, 1996**). Le glimépiride augmente l'activité de la phospholipase-C spécifique du glycosylphosphatidylinositol; cette augmentation pourrait être en rapport avec la lipogenèse et la glycogénogenèse induites

par le médicament dans les cellules adipeuses et musculaires isolées. Le glimépiride inhibe la production hépatique de glucose en augmentant la concentration intracellulaire de fructose 2,6-diphosphate, qui à son tour inhibe la néoglucogenèse (**Pan *et al*, 2011; Muller, 2014**).

### 4.3. Action générale

Chez l'homme sain, la dose minimale efficace par voie orale est de 0,6 mg. L'effet du glimépiride est dose-dépendant et reproductible. L'effet du médicament est similaire, que son administration ait lieu. Chez le diabétique, une dose quotidienne unique permet un contrôle métabolique satisfaisant pendant les 24h qui suivent. Les études réalisées sur le glimépiride ont suggéré un certain nombre d'avantages cliniques par rapport à d'autres sulfonylurées, en particulier, le faible risque d'hypoglycémie, un effet moindre sur le gain de poids et la protection contre les maladies vasculaires athéroscléreuses ainsi que l'hyperinsulinémie moins prononcée (**Muller, 2014**).

### 4.4. En association à un traitement par metformine

Une étude a montré que, chez des patients insuffisamment équilibrés par des doses maximales de metformine, l'association au glimépiride entraînait un meilleur contrôle glycémique par rapport à la metformine seule (**Gu *et al*, 2010**).

### 4.5. En association à l'insuline

Les données relatives à une association à un traitement par l'insuline sont limitées. Chez les patients insuffisamment contrôlés avec une posologie maximale de glimépiride, une association à l'insuline peut être instaurée (**Kabadi & Kabadi, 2006**).

## 5. Pharmacocinétique du Glimépiride

### 5.1. Absorption

La biodisponibilité du glimépiride est totale. La prise d'aliments ne modifie pas l'absorption de manière significative, seule la vitesse d'absorption est légèrement ralentie. La concentration plasmatique maximale (C<sub>max</sub>) est atteinte environ 2 h 30 après la prise (en moyenne 0,3 µg/ml après administration répétée d'une dose journalière de 4 mg). Il existe une relation linéaire entre la dose administrée, la valeur de la C<sub>max</sub> et l'aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps (AUC) (**Langtry & Balfour, 1998**).

### 5.2. Distribution

Le glimépiride a un volume de distribution très faible (environ 8,8 l), comparable à celui de l'albumine, une fixation aux protéines plasmatiques importante (> 99 %) ainsi qu'une clairance faible (approximativement 48 ml/min). Chez l'animal, le glimépiride est retrouvé dans le lait maternel. Le glimépiride franchit la barrière placentaire ; le passage de la barrière hémato-encéphalique est faible (**Langtry & Balfour, 1998**).

### 5.3. Biotransformation et élimination

En cas d'administrations répétées, la demi-vie d'élimination est de 5 à 8 heures. Cependant, à très fortes doses, des demi-vies légèrement plus longues ont été observées. Après administration de glimépiride radiomarké, 58 % de la radioactivité est retrouvé dans les urines et 35 % dans les fèces. Les urines ne contiennent aucune trace de produit initial. Deux métabolites, probablement issus du métabolisme hépatique (l'enzyme principale étant le CYP2C9), ont été identifiés à la fois dans les urines et dans les fèces. Il s'agit d'un dérivé hydroxy et d'un dérivé carboxy du glimépiride (**Langtry & Balfour, 1998 ; Gurjar et al, 2003**).

Les demi-vies terminales d'élimination des deux métabolites du glimépiride sont comprises respectivement entre 3 et 6 heures et 5 et 6 heures après son administration. Il n'a pas été observé de différence des paramètres cinétiques après administration orale unique ou répétée de glimépiride (1 prise quotidienne), la variabilité intra-individuelle étant très faible. Aucune donnée faisant suspecter un risque d'accumulation n'a été observée et aucune modification des paramètres cinétiques n'a été observée en fonction du sexe ou de l'âge (**Langtry & Balfour, 1998 ; Muller, 2014**).

Chez les sujets ayant une clairance de la créatinine diminuée, la clairance plasmatique du glimépiride augmente alors que les concentrations plasmatiques moyennes diminuent, en raison d'une élimination plus rapide due à une diminution de la fixation protéique. Ainsi, l'élimination rénale des deux métabolites est diminuée. Cependant, il ne semble pas y avoir de risque d'accumulation chez ces patients (**Draeger, 1995**).

## 6. Etude préclinique du Glimépiride

Les effets observés chez l'animal ont peu de signification chez l'homme, ces effets ayant été observés avec des expositions bien plus importantes que l'exposition maximale chez l'homme. Ces effets sont dus à l'action pharmacologique (hypoglycémie) du produit.

Le Glimépiride se lie uniquement à une chaîne protéique de 65 kDa des canaux K (ATP) sur les membranes des cellules  $\beta$  pancréatiques et stimule directement la sécrétion d'insuline. Le glimépiride montre une faible affinité de liaison et induit une libération moindre d'insuline que le glibenclamide chez les chiens et les humains normaux. Cependant, dans divers modèles animaux, le glimépiride produit une activité réductrice du glucose sanguin plus rapide et prononcée que le glibenclamide (**Neyrolles *et al*, 1998**).

Les études *in vivo* indiquent que le glimépiride réduit également de manière significative le taux d'HbA1c, la glycémie à jeun et le taux d'insuline par les activités extrapancréatiques. Ces effets mimétiques de l'insuline sont soutenus par la mise en évidence d'une augmentation de la captation cellulaire du glucose par les cellules musculaires et adipocytaires sous l'effet du glimépiride, *in vitro*. Elle semble être liée à une augmentation de l'expression des transporteurs du glucose GLUT 1 et GLUT 4. (**Nguyen *et al*, 1998**)

Les effets sur la sensibilité à l'insuline du glimépiride ont été démontrés *in vivo* par une augmentation du taux d'élimination du glucose dans les études de Clamp euglycémique hyperinsulinémique et *in vitro* par l'augmentation de la sensibilité et de la réactivité de l'absorption du glucose induite par l'insuline (**Nguyen *et al*, 1998**).

De plus, le glimépiride peut stimuler l'utilisation de glucose dans les hépatocytes. Avec l'hypoglycémie induite par l'exercice, la suppression de la sécrétion d'insuline endogène a été observée seulement pour le glimépiride. Les données accumulées à partir des études *in vitro* et chez l'animale suggèrent que le glimépiride possède un effet cardio-protecteur. Ses activités relatives à plusieurs études cardiovasculaires ne sont pas corrélées avec son pouvoir réducteur de la glycémie. Des effets cardiovasculaires semblables ont été observés dans les études humaines (**Mocanu *et al*, 2001**).

Contrairement à l'absence d'une action aiguë, l'application chronique du glimépiride sur des cardiomyocytes cultivées semblait bénéfique pour produire un doublement de la vitesse d'absorption du glucose basal par une voie indépendante de l'insuline impliquant le plus probablement une expression protéique accrue des GLUT1 et GLUT4.

Comme le glibenclamide, le glimépiride a éventuellement une activité antiathérogénique par l'inhibition de l'agrégation des plaquettes via la répression du métabolisme de l'acide arachidonique. Des récentes études sur le rat et chez l'homme

indiquent que le glimépiride possède une activité immunomodulatrice et cette action semble être liée à l'abaissement des réponses auto-immunes, plutôt que l'action métabolique (Nguyen C. *et al*, 1998).

Des études sur animaux ont montré une toxicité sur la reproduction, probablement liée à l'action pharmacologique (hypoglycémie) du glimépiride. En se basant sur des études réalisées sur l'animal, le glimépiride ne doit pas être utilisé pendant la grossesse. L'hypoglycémie sévère prolongée (4 à 10 jours) a été rapportée chez les nouveau-nés de mères recevant le glimépiride ou autres sulfonurées ; le glimépiride traverse le placenta. Chez les animaux, le glimépiride est excrété dans le lait ; chez l'humain, le passage dans le lait maternel n'est pas connu (Vidal, 2010).

### 7. Effet de surdosage du Glimépiride chez l'humain

Un surdosage conduit à une hypoglycémie qui peut durer 12 à 72 h et récidiver après récupération. Les symptômes peuvent survenir jusqu'à 24 h après l'ingestion. En général, une surveillance en milieu hospitalier est recommandée (Fujita *et al*, 2011).

Des nausées, des vomissements ainsi que des douleurs épigastriques peuvent survenir. L'hypoglycémie peut généralement s'accompagner de symptômes neurologiques tels qu'agitation, tremblements, troubles visuels, problèmes de coordination, somnolence, coma et convulsions (Spiller, 1998 ; Vidal, 2010).

Le traitement consiste en premier lieu à prévenir l'absorption en administrant du charbon activé (adsorbant) et du sulfate de sodium (laxatif). En cas d'ingestion de grandes quantités, un lavage gastrique est recommandé, suivi de l'administration de charbon activé et de sulfate de sodium (Vidal, 2010).

En cas de surdosage (sévere), l'hospitalisation au service des soins intensifs est indiquée. Il faut commencer à administrer du glucose le plus rapidement possible, si nécessaire par injection d'un bolus intraveineux de 50 ml ou d'une solution à 50 %, suivie d'une perfusion d'une solution à 10 %, tout en contrôlant strictement la glycémie. Le traitement ultérieur doit être symptomatique (Blicklé, 2011).

Lors du traitement d'une hypoglycémie due à une ingestion accidentelle du Glimépiride par des nourrissons ou de jeunes enfants, la quantité de glucose ingérée doit être soigneusement contrôlée, afin d'éviter la survenue d'une hypoglycémie dangereuse pour l'enfant. (Spiller, 1998 ; Vidal, 2010).



### 8. Effets indésirables du Glimépiride

Les effets indésirables suivants sont basés sur les données disponibles avec Amarel et les autres sulfonylurées. L'effet indésirable le plus connu pour les sulfonylurées est l'hypoglycémie, le Glimépiride est le seul médicament de cette famille qui présente un risque moindre (**Langtry & Balfour, 1998 ; Profozic & Metelko, 1998**). La survenue de ces hypoglycémies dépend du traitement, de facteurs individuels comme les habitudes alimentaires et la dose du médicament (**Korytkowski, 2004**).

Les modifications glycémiques peuvent entraîner, surtout en début de traitement, des troubles visuels transitoires, ces derniers sont rarement enregistrés après traitement par le Glimépiride (**Blicklé, 2011**).

Contrairement aux effets connus pour les Sulfonylurées, des études cliniques ont montré que le glimépiride semble avoir un effet neutre sur la prise du poids corporel (**Bugos *et al*, 2000; Weitgasser *et al*, 2003**)

Au niveau gastro-intestinal: nausées, vomissements, diarrhée sont très rarement trouvés chez les patients traités par le Glimépiride, l'apparition de ces troubles conduit à l'arrêt du traitement (**Profozic & Metelko, 1998**).

Une élévation des enzymes hépatiques ainsi qu'une atteinte de la fonction hépatique (avec par exemple cholestase) a été enregistrée chez des cas cliniques rares (**Chounta *et al*, 2005**). Une pancréatite aigüe a été également rapportée chez un cas clinique (**Duboeuf *et al*, 2004**)

Aucun risque supplémentaire d'accumulation du glimépiride ou d'hypoglycémie n'est à craindre chez les sujets présentant une insuffisance rénale (**Profozic & Metelko, 1998**).

*GENERALITES SUR  
LES MEDICAMENTS  
GENERIQUES*

## GENERALITES SUR LES GENERIQUES

### 1. Historique sur les médicaments génériques

Le médicament générique est connu depuis le début de XX<sup>e</sup> siècle, mais sa définition et les conditions de sa mise sur le marché se sont développées avec le temps :

Le premier système de brevet a été élaboré à Venise en 1474, suivie par l'Angleterre en 1623, et les États-Unis en 1790 après l'indépendance. En 1920, la notion des génériques est connue avec l'aspirine par l'industrie Bayer (**John et al, 1994**).

En 1962, la loi de *Kefauver-Harris* aux Etats Unis, la première procédure visant à vérifier l'innocuité et l'efficacité du médicament générique avant sa mise sur le marché (étude préclinique et clinique à effectuer), donc un cout élevé et une longue durée pour avoir ces génériques (**Masson, 2005**).

En 1970, une accélération des procédures de production des médicaments génériques autorisés avant 1962 a été établie.

En 1975, la commission européenne impose une procédure d'AMM à tous les États membres pour les spécialités pharmaceutiques (**John et al, 1994**).

Entre 1962 et 1984, la FDA n'a approuvé que 16 médicaments génériques.

En 1984, la loi *Hatch-Waxman* est apparue, dont le médicament générique peut être mis sur le marché sans répéter les essais précliniques et humains effectués sur son princeps, les génériqueurs doivent seulement prouver que leur médicament générique contient les mêmes ingrédients actifs et qu'il possède les mêmes effets que le médicament de marque (**Mossinghoff, 1999**).

En 1989, l'autorisation de substitution des génériques a été adoptée par la 41<sup>ème</sup> Assemblée Médicale Mondiale à Hong Kong, puis supprimée par l'Assemblée générale de l'Association Médicale Mondiale à Santiago en 2005 (**L'association médicale mondiale, 2005**).

L'Union Européenne s'est dotée d'une Agence Européenne du Médicament (**EMA, 2010**).

En novembre 2001, les 144 pays membres de l'OMC (l'Organisation Mondiale du Commerce) signaient la déclaration ministérielle sur la santé publique (également appelée Déclaration de Doha) reconnaissant le droit des pays à passer outre les brevets des compagnies pharmaceutiques afin de promouvoir l'accès aux médicaments pour tous (**OMC, 2001**).

Mais la Déclaration ne réglait pas le problème des pays pauvres dépourvus d'industrie pharmaceutique qui ne pouvaient se fournir en médicaments. La plupart des pays pauvres ne disposent pas actuellement de la capacité de produire des génériques. Les brevets appliqués également aux matières premières interdisent, de même, leur exportation : peu de pays sont actuellement capables de fabriquer des matières premières même s'ils sont capables de produire des médicaments. C'est au 30 Aout 2003, que l'OMC a approuvé un compromis sur l'accès des pays pauvres aux médicaments, ce compromis prévoit aux pays pauvres, touchés par une crise sanitaire, de produire ou d'importer un médicament générique sous licence obligatoire de l'OMC, sans même l'autorisation du laboratoire qui détient le brevet du médicament original (**Célérier, 2003**).

### 2. Définition

Le médicament générique d'un médicament leader est un produit qui possède la même composition qualitative et quantitative en Principe Actif, la même forme pharmaceutique et dont la bioéquivalence avec le médicament de marque (princeps) a été démontrée par des études appropriées de biodisponibilité (**Tisseyre, 1983; Antognini, 1987**).

Un générique peut aussi être défini comme la copie d'un médicament original, dont la production et la commercialisation sont rendues possible par l'expiration de la protection, conférée par le brevet couvrant le principe actif original. Le médicament générique est fabriqué par un laboratoire pharmaceutique agréé par les pouvoirs publics. Il doit répondre aux mêmes critères de qualité, efficacité et sécurité (Q, E, S), que le produit de référence et il fait l'objet de contrôles identiques par l'agence du médicament du pays concerné. Le générique n'est pas nécessairement copie conforme du princeps en termes de forme, couleur ou de taille (**Antognini, 1987**).

Le terme médicament générique a été élargi au concept d'équivalence thérapeutique par la note explicative du Comité Européen des Spécialités Pharmaceutiques (décembre 1991) qui recouvre des "produits pharmaceutiques alternatifs" qui peuvent différer par la forme pharmaceutique et la forme chimique du principe actif, si ces différences n'induisent pas de modifications qui pourraient être significatives sur le plan clinique (**EMA, 2001**).

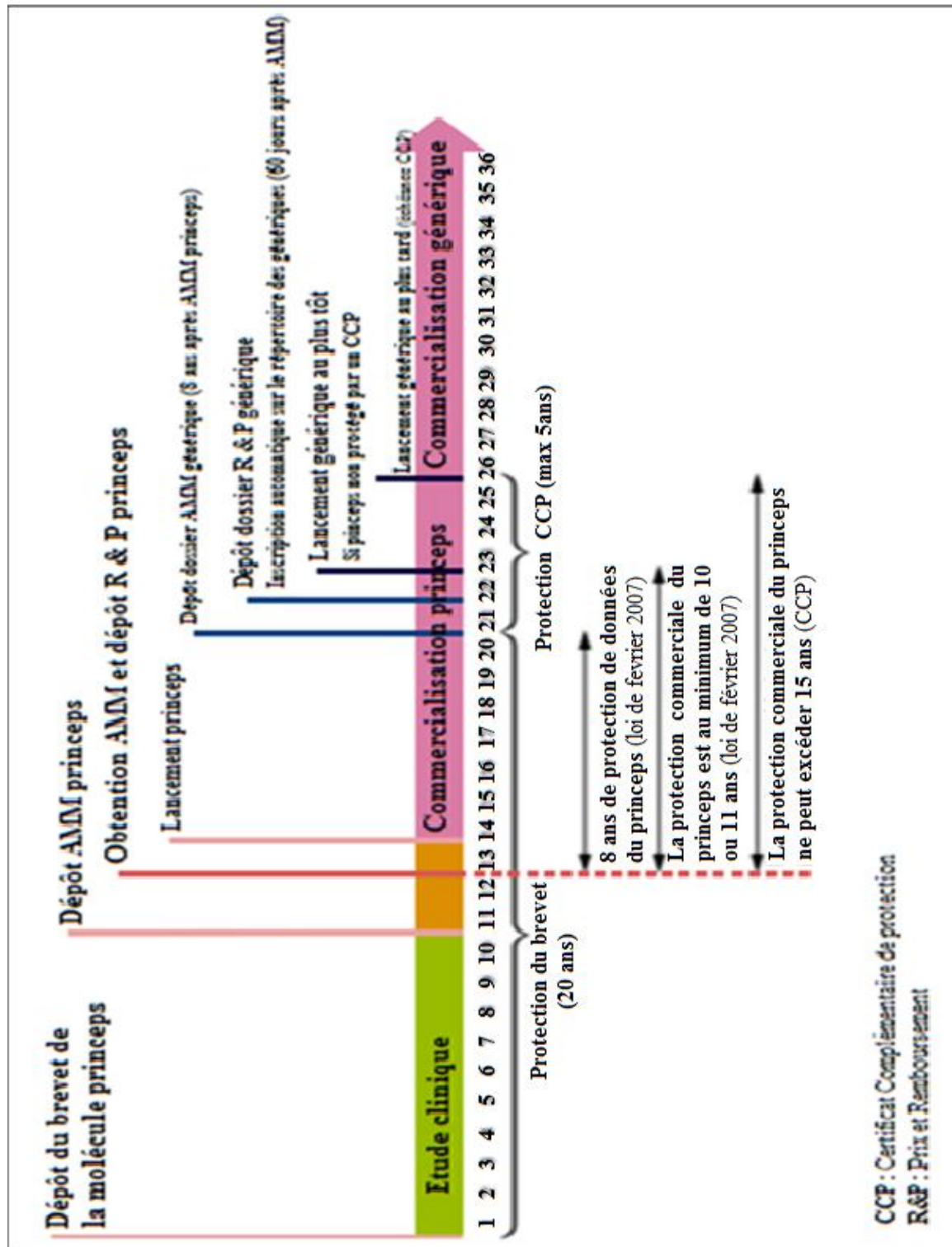


Fig. 3 : Schéma récapitulatif du cycle administratif de vie des médicaments (FNMF, 2008).

Lorsqu'un laboratoire découvre un médicament, il garde l'exclusivité de sa commercialisation jusqu'à l'expiration du brevet. Une copie du produit original peut alors être développée et commercialisée par un autre laboratoire. Le brevet est déposé pour 20 ans par un laboratoire le jour de la découverte d'une nouvelle molécule qu'il pense pouvoir commercialiser. La durée réelle est alors très variable selon le nombre d'années d'études préliminaires et les délais administratifs d'obtention de l'AMM.

La définition des génériques a été finalisée par la loi de 2004 dans le code français, stipulant que les différents sels, esters, éthers, isomères, mélanges d'isomères, complexes ou dérivés d'un principe actif sont considérés comme ayant la même composition qualitative en principe actif, sauf s'ils présentent des propriétés sensiblement différentes au regard de la sécurité ou de l'efficacité (**Anonyme, 2005**).

### **3. Types des génériques**

Trois catégories de génériques peuvent être distinguées en fonction du lien qui les relie au médicament de marque:

#### **3.1. Les génériques copie-copie ou intégraux**

Ce sont des copies exactes du produit leader (même molécule, même quantité de principe actif, même forme galénique, même excipient et, souvent, même fabricant) (**Bagheri, 2007**).

#### **3.2. Les génériques essentiellement similaires ou équivalents**

Possèdent la même quantité et qualité de principe actif, la même forme galénique mais les excipients changent (**Andriollo, 1997 ;Bagheri, 2007**).

#### **3.3. Les génériques "plus" ou assimilables**

Apportent une amélioration à la thérapeutique par une forme galénique différente (comprimé au lieu de gélule), la forme chimique du principe actif change (sel au lieu de base); la bioéquivalence de ces génériques doit également être prouvée par rapport au médicament original (**Andriollo, 1997; Bagheri, 2007**).

**Tableau I: Comparaison entre un médicament princeps et un générique  
(Bagheri, 2007)**

Spécialité Critères	Princeps	Générique		
		Copie	Similaire	Assimilable
Molécule active	Référence	Identique	Identique	Peut différer
Quantité en principe actif	Norme	Conforme	Conforme	Conforme
Forme galénique	Référence	Identique	Similaire	Peut différer
Excipients	Référence	Identique	Différents	Différents
Effet thérapeutique	Référence	Identique	Similaire	Similaire
(SSC, Cmax)	Référence	Identique	similaire ± 20 %	similaire ± 20 %
Coût	Le coût moyen de créer un nouveau médicament est de <b>500 millions à 2 milliards de dollars (US) (Adams &amp; Brantner, 2006).</b>	Le coût moyen de créer un médicament générique de ce même médicament est de <b>1 million de dollars (Adams &amp; Brantner, 2006).</b>		
Temps requis	Le médicament doit être soumis à des tests rigoureux et à plusieurs études précliniques et cliniques qui s'échelonnent sur plusieurs années. Il faut de <b>10 à 15 ans</b> pour créer un seul médicament ( <b>Congressional Budget Office, 1998</b> ).	Il faut de <b>2 à 3 ans</b> environ pour créer une copie générique d'un médicament qui est équivalente sur le plan biologique et identique sur le plan chimique ( <b>Congressional Budget Office, 1998</b> ).		

#### 4. Dénomination des génériques

Il existe plusieurs façons pour nommer un médicament générique :

##### 4.1. La DCI (*Dénomination Commune Internationale*)

C'est le nom qui est adapté d'un nom scientifique de la molécule active contenue dans le médicament. Le système de DCI a été mis en place dans les années 50 au niveau mondial. Il est géré par l'organisation mondiale de la santé.

Lorsqu'une nouvelle molécule est identifiée et jugée digne d'intérêt, elle perd son nom de code utilisé lors des premières phases de recherche et se voit attribuer un nom en DCI.

Le laboratoire découvreur, s'appuyant sur une liste de préfixes et de suffixes caractéristiques des principales familles chimiques, propose plusieurs DCI. Une commission de l'OMS étudie les différentes propositions et la proposition retenue est publiée dans la revue **WHO Drug information** consultable sur le site de l'OMS (OMS, 2003).

##### 4.2. La DCI liés au nom du producteur / distributeur

C'est les médicaments identifiés par le nom scientifique de la ou des substances actives qu'ils contiennent suivi du nom du laboratoire producteur (Briard & Braud, 1995 ; OMS, 2003). Exemples : Ampicilline DAKOTA®, Metronidazole QUALIMED®, Fluorouracile ROCHE®, Héparine DAKOTA®, Gentamycine PANPHARMA®.

##### 4.3. Le nom de marque / fantaisie

C'est le nom choisi par le producteur du médicament. Ce nom est court et facile à mémoriser, afin d'encourager les gens à demander ce produit par son nom. Le même producteur peut disposer de plusieurs noms de marque pour un même médicament (OMS, 2003). Exemples pour le paracétamol : DOLKO®, EFFERALGAN®, DOLIPRANE®, DAFALGAN®, MALGIS®.

##### 4.4. Le nom de fantaisie suivi de « Gé »

Le nom de fantaisie ne peut se confondre avec la dénomination commune. Pour être remboursé, un suffixe « Gé » doit figurer sur le conditionnement (étiquette, notice,



publicité) de ces spécialités génériques, dont le Gé signifie Générique. Exemple: Algoced Gé = générique du Di-Antalvic® (**Antognini, 1987 ; Briard & Braud, 1995**).

### 5. Qualité, efficacité et sécurité des génériques

L'évolution de la définition légale du générique apporte la confirmation que l'on ne peut plus affirmer aujourd'hui que les génériques sont aussi efficaces que les médicaments princeps.

En effet le générique est passé de la copie stricte du médicament princeps à un médicament dont non seulement la présentation, mais aussi la composition quantitative en principe actif et en excipient sont variables (**Tisseyre, 1983**).

Ces critères complémentaires (**Q, E, S**) peuvent difficilement être dissociés et expriment la qualité, au sens large du terme.

#### 5.1. Qualité

L'assurance de la qualité des médicaments génériques et de leur conformité aux exigences réglementaires est un point très important pour leur efficacité thérapeutique.

Pour que le générique obtienne une AMM, le laboratoire demandeur doit fournir les preuves de sa bioéquivalence ainsi qu'un dossier attestant de sa qualité pharmaceutique.

Tous les médicaments commercialisés ont subi des analyses physicochimiques, éventuellement microbiologiques, pour vérifier l'absence de résidus toxiques et de risque infectieux ; leurs qualités organoleptiques, leur bonne conservation, l'emballage, les informations sont portées sur la notice (**Académie nationale de Pharmacie, 2012**).

La qualité des génériques dépend des matières premières, de la fabrication, du conditionnement et de la validation des procédures analytiques et de fabrication qui reprend en détail chacune de ces étapes depuis l'origine des matières premières, leurs spécificités et leurs contrôles, jusqu'au conditionnement final, ainsi que des études de stabilité qui permettent de déterminer la durée de vie du produit.

La qualité est aussi garantie par les audits faits par les inspecteurs des autorités des affaires réglementaires pour déterminer le respect des BPF (Bonne Pratique de la Fabrication). Or la garantie de la qualité d'un médicament ne peut se résumer à un certificat de BPF et aux résultats des tests de Contrôles Qualités (CQ), qui, seuls, peuvent

induire de fausses sécurités. Le CQ n'est qu'un outil qui, associé à un référentiel, apporte des éléments de vérification de certains critères du médicament. Le médicament doit répondre à trois critères: Qualité, Efficacité, Sécurité (Q, E, S) (OMS, 2008).

Plusieurs études sont montrées que les formulations génériques avaient un taux d'impureté total supérieur à 3 % par rapport à la formulation de la marque. Ce facteur pourrait affecter la biodisponibilité du médicament et, par conséquent, son efficacité thérapeutique (Tange *et al*, 2012).

### 5.2. Efficacité

Les génériques font rarement l'objet d'études cliniques concernant leur efficacité. Ils contiennent le même principe actif que le médicament de marque, à quantité égale. Mais ce qui peut varier, ce sont les excipients, ces substances qui véhiculent la molécule dans l'organisme. Le générique doit avoir la même biodisponibilité que le princeps, dont le principe actif doit se propager de la même façon dans l'organisme. Ce n'est que si le profil de diffusion est similaire que l'autorisation de mise sur le marché est accordée (Ramenskaya & Shokhin, 2009). Une petite variation de biodisponibilité est acceptée.

La biodisponibilité se réfère à la vitesse et à l'intensité à laquelle un médicament administré sous une forme pharmaceutique donnée (comprimé, gélule, injection intramusculaire, injection sous-cutanée) va être absorbé et dispersé dans le flux sanguin, et à la fraction thérapeutique qui réagit au niveau des sites actifs des organes cibles (OMS, 1996).

La biodisponibilité d'un principe actif est influencée par des facteurs intrinsèques (granulométrie, polymorphisme, solubilité, degré de pureté...) et extrinsèques (adjuvants de fabrication et de conservation, pelliculage et emballage du produit fini) sans compter les variations interindividuelles.

La bioéquivalence correspond à l'équivalence des biodisponibilités. La biodisponibilité est la mesure de la vitesse et l'intensité de l'absorption par l'organisme de la substance active, à partir d'une forme pharmaceutique définie (OMS, 1996) (Fig.4).

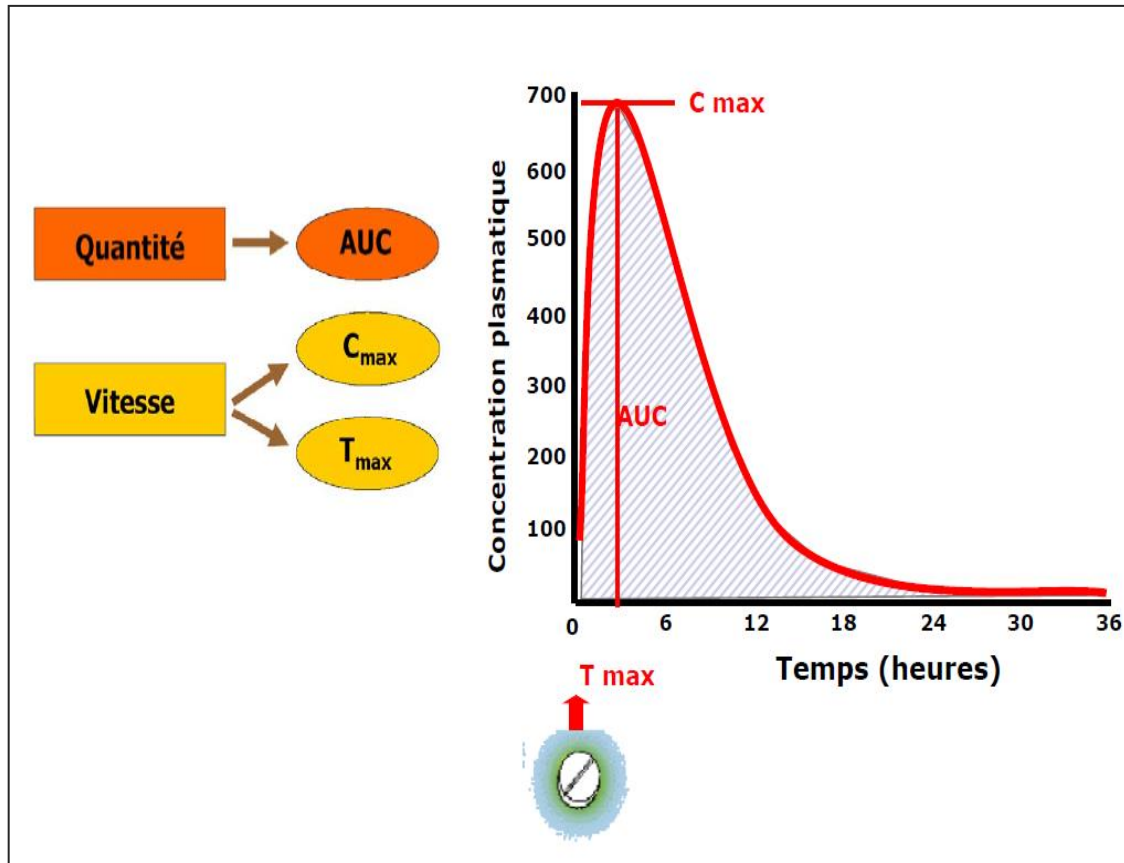
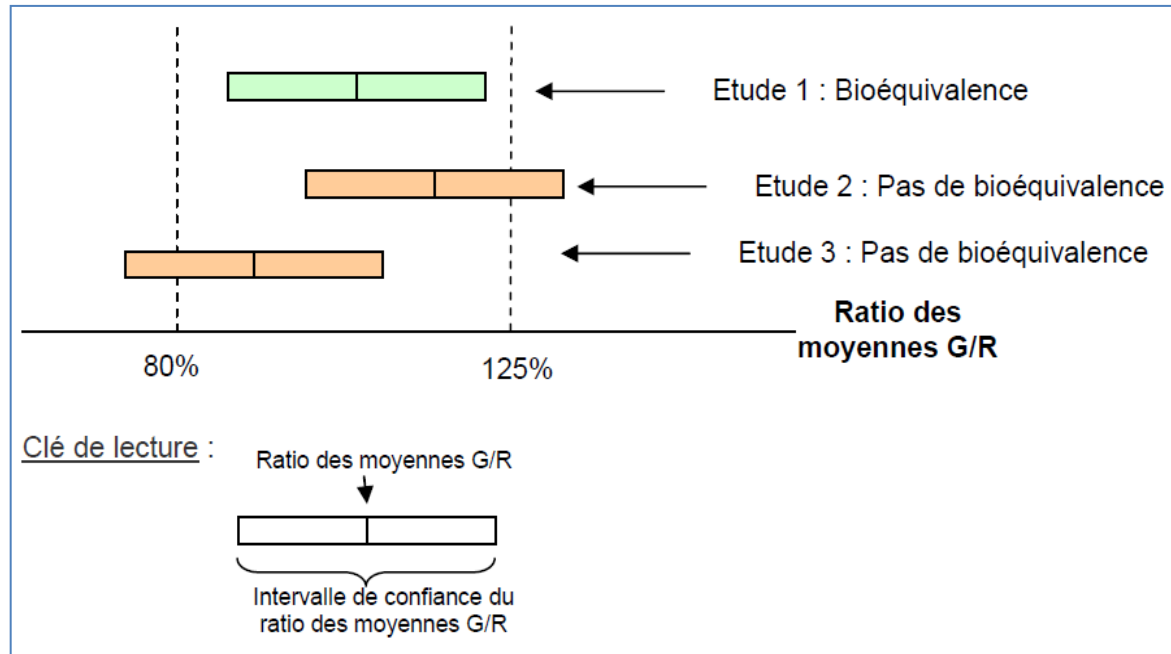


Fig. 4 : Mesure de la biodisponibilité (OMS, 1996)

Les médicaments génériques doivent montrer une bioéquivalence à leurs médicaments de référence, dont ils peuvent être interchangeables, donc thérapeutiquement équivalents et les deux médicaments (générique et princeps) sont absorbés dans le flux sanguin à la même vitesse et dans la même proportion (Scicchitano *et al*, 2012).

Un médicament générique est considéré comme interchangeable lorsque l'équivalence thérapeutique est prouvée, différentes méthodes peuvent être proposées : des essais cliniques comparatifs; des études pharmacodynamiques comparatives chez l'homme (bioéquivalence) ainsi que des épreuves de dissolution *in vitro* (OMS, 1996).

Deux médicaments sont bioéquivalents si les limites [min et max] de l'intervalle de confiance à 90 % (IC 90%) du rapport générique *versus* princeps calculées pour la surface sous la courbe (SSC) et la concentration plasmatique maximale (Cmax) sont incluses dans l'intervalle [- 20 %, + 25 %]. Cet intervalle s'applique donc à l'IC 90% des rapports de SSC (ou Cmax) et non pas directement au rapport de leurs valeurs (Fig.5).



**Fig. 5 : l'intervalle de confiance de l'étude de bioéquivalence (ANSM, 2012)**

En conséquence, il est faux de considérer qu'il y a une variation de -20% à + 25% entre un générique et un *princeps* de SSC (et donc de biodisponibilité). C'est pourtant ce que l'on peut lire dans la littérature scientifique médicale avec parfois des extrapolations erronées (Le Corre, 2010).

La bioéquivalence s'établit pour un générique vis-à-vis d'un médicament *princeps*. En conséquence, deux génériques d'un *princeps* ne satisfont pas automatiquement à ce critère de bioéquivalence. Leur interchangeabilité peut poser un problème en particulier pour des médicaments à marge thérapeutique étroite (IGAS, 2012).

Dans ce contexte, au moins au niveau physiologique, les médicaments génériques doivent se comporter de manière très similaire à leurs *princeps* et par conséquent, en théorie, montrent une efficacité similaire. En fait, une étude de 2070 cas cliniques de bioéquivalence comparant des doses uniques des médicaments génériques administrés par voie orale approuvé par la Food and Drug Administration (FDA), de 1996 à 2007, a démontré que les produits ne diffèrent pas significativement (Davit *et al.*, 2009).

D'autre part, plusieurs études ont documenté le développement d'effets secondaires ou d'échec clinique après le passage du traitement par les médicaments de marque à la formulation générique (Jain, 1993 ; Privitera, 2008 ; Ringe & Möller, 2009 ; Diez-Perez *et al.*, 2012 ; Kanis *et al.*, 2012 ; De Vuono *et al.*, 2013a ; De Vuono *et al.*, 2013 b).

### 5.3. Sécurité

La **sécurité** ou innocuité est déterminée par les études: de pharmacocinétique, de toxicocinétique et de toxicologie, de carcinogenèse et de tératogenèse (**Scicchitano et al, 2012**).

En général, il est important de réaliser que les excipients sont des ingrédients essentiels, sans effets thérapeutiques, qui assurent la stabilité de la substance active et optimisent sa distribution pour une meilleure biodisponibilité **De Vuono et al, 2013b**).

Théoriquement, les génériques sont strictement bioéquivalents aux principes cependant, les excipients peuvent être différents. Selon les patients, le changement de produit, entraînant occasionnellement un changement d'excipients, peut engendrer un risque clinique grave: cas du saccharose, du sodium ou du potassium...etc qui peuvent être gravissimes chez les patients atteints de diabète ou de pathologies rénales. Une étude a suggéré qu'une explication possible de la différence clinique entre la formulation de la marque et un modèle générique peut être représentée par la différence dans les excipients (**Versantvoort et al, 2008**).

En fait, les excipients susceptibles d'influer sur le transit gastro-intestinal (sorbitol et mannitol) ; l'absorption (tensioactifs ou excipients affectant les protéines de transport) ; la solubilité *in vivo* (Co-solvants); la stabilité *in vivo* de la substance active sont également indiqués dans la ligne directrice de l'Agence Européenne de Médecine pour la bioéquivalence (European Medicines Agency) (**EMA, 2010**)

De plus, plusieurs études ont documenté que la différence en excipients est liée à la perte de la réponse au cours du traitement avec les formulations génériques. (**Blencowe et al, 2010 ; De Vuono et al, 2013b**).

## 6. AMM des génériques

Afin de maintenir les normes de santé publique, les Autorisations de Mise sur le Marché (AMM) assurent que les médicaments sont sûrs, efficaces et de bonne qualité. Des résultats détaillés des essais cliniques et précliniques doivent être fournis pour un nouveau médicament. Les médicaments génériques ont également besoin d'autorisations de mise sur le marché, mais les dossiers de demandes n'ont pas besoin de contenir les résultats détaillés des essais s'il est démontré que le produit générique est équivalent à un

médicament précédemment autorisé. Cependant, les demandes abrégées de cette nature ne sont autorisées qu'une fois que les données des entreprises innovantes sur les essais cliniques et/ou précliniques ne sont plus protégées (**OMS, 2008**).

Les procédures d'autorisation de mise sur le marché sont réglementées selon le droit de l'Union Européenne (UE). Il existe une procédure de demande centralisée menant à une autorisation pour l'ensemble de l'UE ou des procédures nationales ayant pour résultat des autorisations nationales qui peuvent bénéficier d'une reconnaissance mutuelle dans les autres Etats Membres (**OMS, 2008**).

Si un médicament est autorisé depuis au moins dix ans dans un Etat Membre de l'Union européenne et qu'en outre, le brevet est échu, il peut être mis sur le marché comme médicament générique. Le demandeur peut alors faire référence aux résultats des études réalisées sur le médicament original (le médicament de référence), pour autant que les deux produits soient "essentiellement similaires". Il s'agit d'un dossier abrégé (**Blencowe et al, 2010**).

### 7. Substitution des médicaments

L'inscription d'un médicament générique sur le répertoire ouvre le droit à la substitution et fixe les conditions de substitution. En France par exemple, depuis 1999, le pharmacien peut substituer / délivrer une spécialité du même groupe générique.

Pour des raisons motivées contrôlées par l'assurance maladie, le médecin conserve le droit à la substitution. Il stipule alors sur son ordonnance devant le nom de la spécialité visée : « non substituable » afin que le pharmacien fournisse le médicament d'origine et non le générique. Le médecin a le devoir de signaler les effets indésirables ou les échecs thérapeutiques qui pourraient avoir un lien étroit avec la substitution de médicaments; ces constatations doivent être documentées et rapportées aux autorités réglementaires adéquates, y compris l'association médicale correspondante (**L'Association Médicale Mondiale, 2005**).

Lors de l'interchangeabilité, le pharmacien doit tenir compte de la présence ou non d'excipients à effet notoire. En cas d'effet indésirable, sa responsabilité est engagée.

Pour les médicaments dits "à marge thérapeutique étroite" (anticoagulants, antiépileptiques, antidiabétiques, hormones thyroïdiennes etc.), une différence même légère de la dose libérée dans l'organisme peut entraîner une variation de leur effet.

Quelques études au sujet de médicaments sur le système nerveux central ont mis en évidence ce genre de problème (**Belon *et al*, 2001**).

La biodisponibilité de la phénytoïne, un antiépileptique, a été modifiée suite à une substitution par un générique. "Cette étude réalisée aux USA, a mis en évidence une réduction des taux sériques de l'ordre de 30% lors de la substitution de la spécialité par un générique chez huit patients, avec aggravation clinique en termes de nombre de crises" (**Benoît & Hervé, 2003**).

### **8. La stabilité des médicaments génériques**

La stabilité d'un médicament peut être définie comme son aptitude à conserver ses propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans des limites spécifiées pendant toute sa durée de conservation.

La stabilité des préparations pharmaceutiques dépend de paramètres extrinsèques (température, humidité et lumière) et intrinsèques (propriétés physicochimiques de la molécule et de ses excipients) (**Giron, 1988**).

Parmi ces derniers, il faut différencier les facteurs liés aux matières premières, à la forme pharmaceutique et au conditionnement. La durée de vie du produit, dans les conditions de stockage et de conservation, en temps réel, sera déterminée par les études de stabilité.

### **9. Les génériques en Algérie**

Devant les dépenses énormes de l'état algérien sur l'importation des médicaments et le développement de la population, l'Algérie, comme tous les pays en voie de développement, a opté pour les médicaments génériques, la production de ces médicaments, pourrait réduire les frais dépensés sur les médicaments princeps protégés par brevet dans les pays développés (**Ouali M, 2008**).

En 2008, le gouvernement algérien a adopté une loi visant à interdire l'importation d'une première liste de médicaments déjà fabriqués localement en quantités suffisantes pour réduire sa facture d'importation. Cette interdiction concerne 359 médicaments dont les besoins sont couverts à 100 % par la production locale (**Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière, 2008**).

Malgré un prix relativement abordable, le médicament générique n'arrive toujours pas à s'imposer sur le marché pharmaceutique algérien, le malade portant souvent son choix sur la molécule d'origine, ou le princeps, pendant que le médecin semble hésiter, de son côté, à le prescrire (**Abed, 2013**).



# *PARTIE PRATIQUE*

*MATERIELS*  
*ET METHODES*

## MATERIEL ET METHODES

### 1. Matériel végétal

#### 1.1. Présentation de l'espèce

*Zygophyllum cornutum* Coss est un arbrisseau de terrains salés, endémique dans les régions présahariennes et les hauts plateaux. C'est une plante vivace qui pousse en buissons ramifiés, à feuilles composés par deux Folioles cylindriques et charnues de même couleur que les rameaux. A l'aisselle des feuilles naissent de très petites fleurs blanches à cinq pétales. Les fruits composés de cinq segments cornus au sommet, prennent une coloration ocre-violacé à maturation. Certaines variétés ont des fruits assez gros de couleur violacée et à segments recourbés au sommet, comme des crochets (Baba Aissa, 2000).

#### Systématique

Règne : *Plantae*.

Sous-règne : *Tracheobionta*.

Division : *Magnoliophyta*.

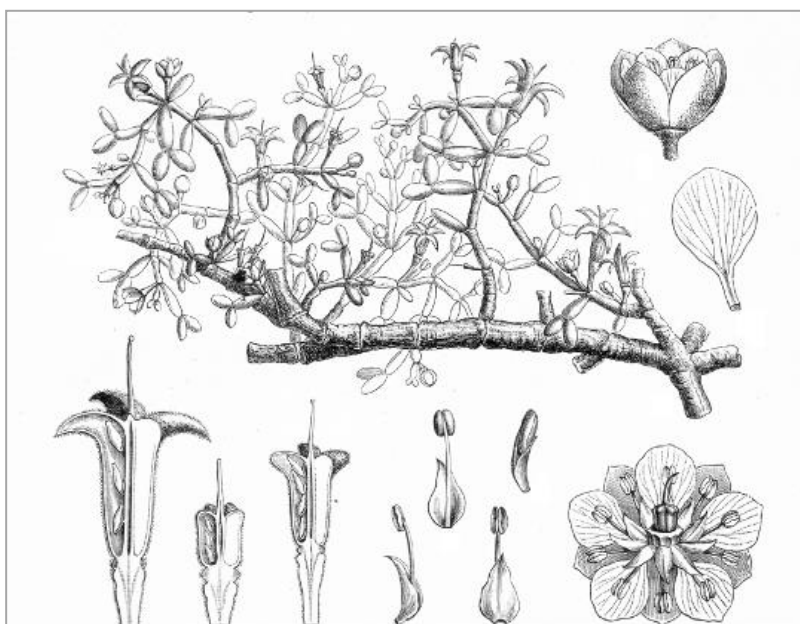
Classe : *Magnoliopsida*.

Sous-classe : *Rosidae*.

Ordre : *Sapindales*.

Famille : *Zygophyllaceae*.

Genre : *Zygophyllum*.



Espèce: *cornutum* Coss.

Nom commun: Zygophille.

Nom vernaculaire : Bougriba- Agga - Agaya. (Perez & Paris, 1958 ; Baba Aissa, 2000)

**Fig. 6 : Image illustrative des différents composés de la plante *Zygophyllum cornutum* Coss (Baba Aissa, 2000).**

#### 1.2. Utilisation ethnopharmacologique

Elle est utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement du diabète, les inflammations et les douleurs du tube digestif. Comme hypoglycémiant, *Zygophyllum cornutum* est utilisée sous forme de poudre ou décoction dont le goût est amer et salé. On

l'emploie aussi pour les soins corporels des nourrissons et comme cicatrisant externe (Perez & Paris, 1958 ; Ozenda, 1977)

**Parties utilisées :** partie aérienne ; **Mode d'utilisation :** décoction, cataplasmes.

Les données rassemblées sur l'utilisation traditionnelle de cette herbe pour le traitement du diabète font ressortir que la plante était consommée sous forme de décocté. De ce fait, on s'est basé sur l'évaluation de l'extrait aqueux tel qu'il est administré par la population.



**Fig.7 : Photos prises de la plante *Zygodontia cornutum* Coss.**

### **2. Produits pharmaceutiques**

Dans cette étude, nous avons utilisé l'Amarel, le princeps de la molécule Glimépiride et un de ses génériques, fabriqué dans une industrie nationale algérienne ; les doses ont été calculées par rapport aux poids corporels.

### **3. Animaux et conditions d'élevage**

L'étude a porté sur des rats Wistar albinos mâles provenant de l'institut Pasteur (Centre d'élevage de Kouba-Alger). Ces rats pèsent entre 180-200 g.

A leur arrivée les rats ont été séparés et répartis en lots par cages ayant un libre accès à l'eau et à la nourriture. Ils sont maintenus dans des conditions de luminosité, de température ambiantes et d'hygiène ; le nettoyage des cages et le changement de la litière se faisait quotidiennement.

Les expérimentations ont été réalisées selon les directives du *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 2010).

Les rats ont été nourris par un régime alimentaire standard commercialisé par l'UAB de Bejaia (Unité des Aliments de Bétails) dont la composition est présentée sur le **Tableau II**.

**Tableau II: Composition de l'alimentation pour 1 kilogramme d'aliment**

Matière alimentaire	Quantité en g/kg d'aliment	Quantité en pourcentage (%)
Mais	620	62
Soja	260	26
Phosphate	16	1.6
Calcaire	9	0.9
Cellulose	10	1.0
Minéraux	10	1.0
Vitamines	10	1.0

#### 4. Etude physicochimique des produits pharmaceutiques

##### 4.1. Etude physicochimique de la matière première du générique

La matière première, sous forme de poudre est analysée selon les directives de la Pharmacopée Européenne (Ph. Eu., 2011).

##### 4.1.1. Aspect et solubilité

L'aspect est déterminé visuellement, la poudre doit être blanche ou sensiblement blanche, inodore, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans le diméthylformamide, peu soluble dans le chlorure de méthylène et très peu soluble dans le méthanol.

##### 4.1.2. Identification par infrarouge (IR)

Le Glimépiride est identifié par spectrophotométrie d'absorption dans l'Infrarouge qui permet de confirmer l'identité de la substance. Le spectre infrarouge de la poudre peut être

obtenu directement à l'aide d'une pastille de KBr afin de le comparer à celui de la substance Glimépiride de référence (Moffat *et al*, 2004).

On mélange à peu près 1 mg de l'échantillon homogénéisé à 200 mg de bromure de potassium (grade infrarouge) soigneusement séché et broyé. Ce mélange est ensuite pressé afin d'obtenir une fine pastille transparente.

Les substances transformées en pastilles sont analysées et les spectres sont comparés avec celui du standard.

### 4.1.3. Dosage du principe actif Glimépiride

- **Conditions expérimentales**

**Colonne:** C18, Waters Spherisorb 5µm ODS2 4,6mm x100mm (PSS831912); **phase mobile:** Tampon phosphate /Acétonitrile (500ml /500ml); **système d'élution:** isocratique; **débit du solvant:** 1,0 ml /min; **volume injecté (boucle):** 20 µl; **température :** 20 à 25°C; **longueur d'onde de révélation :** 228 nm; **temps d'analyse :** 8 à 10 min.

- **Préparation des solutions**

#### *Préparation de la phase mobile*

On dissout 0,5 g Sodium dihydrogène phosphate monohydrate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) dans une fiole de 500 ml et QSP 500 ml avec l'eau purifiée, on ajoute 500 ml d'Acétonitrile, puis on ajuste le pH de la phase mobile à 3 avec l'acide Phosphorique 20 %. On filtre la solution avec un filtre de nature HVLP de 0,45 µm. la phase mobile est dégazée avant utilisation au bain à ultrasons pendant 2 min.

#### *Solutions standard*

On pèse 100,0 mg de Glimépiride de référence, on les dissout avec l'acétonitrile 80 % (ACN 80 % / Eau 20 %) dans une fiole de 100 ml, et QSP 100 ml avec le même solvant. On obtient la solution standard **1 (SS1)**.

On prélève 5 ml de la solution SS1 et QSP 50 ml avec le même solvant dans une fiole. C'est la préparation SS<sub>2</sub> 100 µg/ml équivalent à 100 % en PA.

### *Solution à examiner*

On pèse 100 mg de Glimépiride, on les dissout avec l'acétonitrile 80% (ACN 80%/ Eau 20%) dans une fiole de 100 ml et QSP 100 ml avec le même solvant. C'est la solution SE.

- **Analyse par HPLC et calcul de titre en Glimépiride**

La solution standard SS<sub>2</sub> à 100 µg/ml ainsi que les échantillons sont analysés par HPLC et le titre en Glimépiride (%) est calculé selon la formule suivante :

$$Tpa = \left( \frac{SSC_{SE}}{SSC_{SS2}} \right) \times \left( \frac{C.sd.mes}{C.sd.th} \right) \times t$$

**T<sub>pa</sub>** : titre en principe actif de Glimépiride de l'échantillon.

**t** : titre en % du standard utilisé.

**SSC<sub>SS2</sub>** : aire du pic Glimépiride dans la solution standard SS<sub>2</sub>.

**SSC<sub>SE</sub>** : aire du pic Glimépiride dans la solution à examiner SE.

**C.sd.mes** : Concentration du standard Glimépiride de référence mesurée.

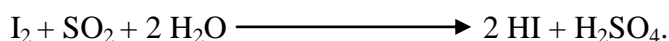
**C.sd.th** : Concentration du standard Glimépiride théorique. (100,0 mg).

- **Norme** : le titre en principe actif Glimépiride doit être compris entre 97,0 et 102,0 %.

#### **4.1.4. Teneur en eau**

- **Principe**

La teneur en eau est déterminée par microdosage selon la méthode de **Karl-Fischer (1939)** qui repose sur la réaction de **R.W. Bunsen (1853)** :



Le titrage coulométrique de l'eau repose sur la réaction quantitative de l'eau avec du dioxyde de soufre et de l'iode dans un milieu anhydre, en présence d'une base qui présente une capacité tampon suffisante.

L'iode produit au niveau de l'anode réagit immédiatement avec l'eau et le dioxyde de soufre contenus dans la cuve. La quantité d'eau contenue dans la substance est directement proportionnelle à la quantité d'électricité jusqu'au point de fin de titrage.

Lorsque toute l'eau contenue dans la cuve est consommée, le point de fin de titrage est atteint ; il apparaît alors un excès d'iode. 1 mole d'iode correspond à 1 mole d'eau, une quantité d'électricité de 10,71 C correspond à 1 mg d'eau.

- **Mode opératoire**

On dissout 0,250 g de glimépiride dans 5,0 ml du diméthylformamide, on effectue l'essai sur 1,0 ml de solution et on effectue un essai à blanc dans un titrateur KF Metler Toledo.

- **Norme :** la teneur en eau ne doit pas dépasser 0,5 pour cent.

### 4.1.5. Cendres sulfuriques

Elles permettent de quantifier les substances inorganiques contenues dans la matière première. Les cendres sulfuriques résultent de la calcination au contact de l'air après attaque par l'acide sulfurique (**Ph. Eu., 2011**).

Ces cendres sont déterminées sur 1,0 g de Glimépiride selon le protocole suivant :

- On chauffe un creuset de porcelaine à  $600 \pm 50^\circ\text{C}$  pendant 30 min. on laisse refroidir dans un dessiccateur sur du gel de silice puis on pèse le creuset vide (Masse vide  $M_v$ ).
- Dans le creuset, on introduit 1,0 g de Glimépiride puis on pèse (Masse initiale  $M_i$ ).
- On humecte la poudre avec 1 ml d'acide sulfurique R et on chauffe doucement, à une température aussi faible que possible, jusqu'à carbonisation complète de l'échantillon.
- Après refroidissement, on humecte le résidu avec 1 ml d'acide sulfurique.
- On chauffe doucement jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement de fumées blanches, puis on calcine à  $600 \pm 50^\circ\text{C}$  jusqu'à incinération complète du résidu.
- On laisse refroidir le creuset dans un dessiccateur sur gel de silice, puis on pèse à nouveau (Masse finale  $M_f$ ).
- **Formule de calcul :** le pourcentage de résidu est calculé comme suit :

$$\text{Résidu à la calcination (\%)} = \left( \frac{M_i - M_f}{M_i - M_v} \right) \times 100$$

- **Norme :** Le taux des cendres sulfuriques doit être inférieur ou égal à 0,1 %.

### 4.2. Etude physicochimique du produit fini

Cette étude physicochimique a été réalisée sur le générique et le princeps selon les procédés de la pharmacopée américaine (**Gonikberg, 2011; USP, 2012**).



### 4.2.1. Aspect du comprimé

Un contrôle visuel de la forme, la taille et la couleur du comprimé (cp) est réalisé, il doit être ovale, sécable, bombé 10 x 5 mm de couleur verte (cp de 2 mg) ou bleue (cp de 4 mg).

### 4.2.2. Identification et quantification du Glimépiride

- **Conditions opératoires**

**Colonne:** C18, Waters Spherisorb 5µm ODS2 4,6 mm x100mm (PSS831912) ; **System d'élution :** isocratique ; **Température:** 20 à 25 °C; **Longueur d'onde de révélation:** 228 nm; **Débit du solvant:** 1,0 ml/min ; **Pression:** 68 bars; **Temps d'analyse:** 8 à 10 min; **Volume injecté (boucle):** 20 µl ; **Phase mobile :** Tampon phosphate / Acétonitrile (500 ml / 500 ml) à pH environ 3.

- **Préparation des solutions**

#### *Phase mobile*

0,5 g de Sodium dihydrogène phosphate monohydrate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 1\text{H}_2\text{O}$ ) sont dissous avec 500 ml d'eau purifiée, on ajoute 500 ml d'Acétonitrile, puis on ajuste le pH de la phase mobile à 3 avec l'acide Phosphorique 20 %. On Filtre cette solution à l'aide d'un filtre de nature HVLP de 0,45 µm. La phase mobile est Dégazée avant utilisation au bain à ultrasons pendant 2 min.

#### *Solutions standard*

On pèse 100,0 mg de Glimepiride de référence, on les dissout avec l'acétonitrile à 80% (ACN 80% / Eau 20%) dans une fiole de 100 ml et QSP 100 ml avec le même solvant. On obtient la solution standard 1 (**SS<sub>1</sub>**). On réalise une dilution de 5 ml de la solution SS1 dans 50 ml du même solvant. On obtient la solution standard 2 (**SS<sub>2</sub>**) à 100 µg/ml équivalent à 100 % en principe actif (PA).

#### *Solutions à examiner*

**Glimépiride comprimé 2 mg :** On ajoute 5 ml d'eau purifiée à 5 comprimés (2 mg) dans une fiole de 100 ml, on l'introduit au bain à ultrason pendant 2 min et QSP 100 ml avec l'acétonitrile à 80 %. Après Centrifuger pendant 10 min à 3700 trs/min, on obtient la Solution Echantillon SE équivalente à environ **100 µg/ml**.

**Glimépiride comprimé 4mg** : On ajoute 5 ml d'eau purifiée à 5 comprimés (4 mg) dans une fiole de 200 ml, on l'introduit au bain à ultrason pendant 2 min et QSP 200 ml avec l'acétonitrile à 80%. Centrifuger pendant 10 min à 3700 trs/min. C'est la Solution Echantillon SE équivalente à environ **100 µg/ml**.

- **Analyse par HPLC et calcul du titre en Glimépiride**

La solution standard SS<sub>2</sub> à 100 µg/ml ainsi que les échantillons sont analysés par HPLC et le titre en Glimépiride (%) est calculé selon la formule suivante :

$$Tpa = \left( \frac{SSC_{SE}}{SSC_{SS2}} \right) \times \left( \frac{m.sd_{mes}}{m.sd_{th}} \right) \times t$$

**T pa**: titre en % de principe actif (Glimépiride) de l'échantillon.

**t** : titre en % de Glimépiride du standard (99%).

**SSC<sub>SS2</sub>** : aire du pic Glimépiride dans la **solution standard** SS<sub>2</sub>.

**SSC<sub>SE</sub>**: aire du pic Glimépiride dans la **solution à examiner** SE.

**m.sd<sub>mes</sub>** : masse du standard Glimépiride de référence mesurée.

**m.sd<sub>th</sub>** : masse du standard Glimépiride théorique (100,0 mg).

- **Norme** : le titre en Glimépiride dans l'échantillon est limité de 90,0 à 110,0 % par rapport au titre du standard.

### 4.2.3. Essai de dissolution

L'essai de dissolution est déterminé par HPLC dont les conditions opératoires sont celles du dosage du principe actif (§ 4.2.2).

- **Conditions de l'essai**

**Milieu de dissolution** : le tampon phosphate à pH 7,8 ± 0,05; **Température**: 37±0,5 °C; **Volume dans chaque récipient**: 900 ml; **Méthode** : Palette; **Vitesse d'agitation** : 75 tr/min.

- **Préparations des solutions**

#### *Milieu de dissolution*

On pèse 0,58 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 11,11 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, on les dissout dans 1000 ml d'eau purifiée. Le pH est ajusté à 7,8 ± 0,05 avec une solution d'hydroxyde de sodium à 10 N ou une solution d'acide phosphorique diluée.

### *Solutions standard pour la dissolution*

On pèse 111,11 mg de Glimepiride de référence, on les transferts dans une fiole de 100 ml, on les bien dissous avec l'acétonitrile 80 % (ACN 80 % / Eau 20 %) et QSP 100 ml avec le même solvant. C'est la solution standard 1 (SS1).

On prélève 2 ml de la solution SS1 et QSP 20 ml avec le même solvant. On obtient la préparation SS<sub>2</sub> **100 µg/ml**.

On prélève 2 ml (pour le comprimé 2 mg) ou 4 ml (pour le comprimé 4 mg) de la solution SS<sub>2</sub>, on l'introduit dans 100 ml milieu de dissolution (tampon phosphate pH 7,8).

On obtient théoriquement une solution SS<sub>3</sub> à 2,22 µg/ml (pour le comprimé 2 mg) ou 4,44µg/ml (pour le comprimé 4 mg); équivalent à 100 % en PA.

### *Solutions à examiner*

On remplit six récipients de contrôle par 900 ml du liquide de dissolution chacun et on met dans chaque récipient un comprimé et on l'immerge par le liquide de dissolution. Après 15 min, on prélève 10 ml de chaque récipient dans des tubes à centrifuger.

On les centrifuge pendant 5 min à 3700 trs/min. Les surnageants constituent les solutions échantillons (SE) à 2,22 µg/ml pour le comprimé 2 mg et 4,44µg/ml pour le comprimé 4 mg qui seront analysées.

### • **Analyse par HPLC et calcul du titre en Glimépiride**

La solution standard SS<sub>3</sub> à 2,22 µg/ml ainsi que les échantillons sont analysés par HPLC et le titre en Glimépiride (%) est calculé selon la formule suivante :

$$Tpa = \left( \frac{SSC_{SE}}{SSC_{SS3}} \right) \times \left( \frac{m.sd_{mes}}{m.sd_{th}} \right) \times t$$

**Tpa** : titre en % du principe actif (Glimepiride) de l'échantillon.

**t** : titre en % de Glimepiride du standard (99%).

**SSC<sub>SS3</sub>** : aire du pic Glimepiride dans la solution standard SS<sub>3</sub>.

**SSC<sub>SE</sub>** : aire du pic Glimepiride dans la solution à examiner SE.

**m.sd<sub>mes</sub>** : masse du standard Glimepiride de référence mesurée.

**m.sd<sub>th</sub>** : masse du standard Glimepiride théorique (111,11 mg).

- **Norme:** le pourcentage de dissolution doit être supérieur ou égal à  $\geq 80 \%$  après 15 min.

#### 4.2.4. Test de désintégration

Six (06) comprimés sont placés du médicament dans le tamis de l'appareil de désintégration, le liquide de désintégration étant l'eau purifiée à  $37 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- **Norme :** le temps de désintégration doit être inférieur ou égal à **15 min.**

#### 4.2.5. L'uniformité de masse

L'uniformité masse est évaluée selon deux techniques :

##### *Détermination de la masse moyenne*

20 comprimés du médicament sont pesés individuellement. La masse moyenne est évaluée selon un modèle statistique qui détermine Max, Min et la moyenne puis on trace la courbe d'uniformité de masse selon les limites indiquées.

**Norme :** La masse individuelle de 2 comprimés sur les 20 unités au maximum peut s'écarter de la masse moyenne à plus de 7,5 %, mais la masse d'aucun comprimé ne peut s'écarter du plus du double de ce pourcentage (15 %).

##### *Dosage du principe actif lors d'essai Uniformité de teneur*

L'essai est réalisé dans les mêmes conditions opératoires que le dosage du principe actif en utilisant la même solution standard (§4.2.2).

**Glimépiride comprimé 2 mg :** On ajoute 1 ml d'eau purifiée à un comprimé dans une fiole de 20 ml, on l'introduit au bain à ultrason pendant 2 min et QSP 20 ml avec l'acétonitrile 80%. Après centrifugation pendant 10 min à 3700 trs/min, on obtient la solution SE équivalente à environ **100 µg/ml**.

**Glimépiride comprimé 4 mg :** On ajoute 1 ml d'eau purifiée à un comprimé dans une fiole de 50 ml, on l'introduit au bain à ultrason pendant 2 min et QSP 50 ml avec l'acétonitrile 80%. Après centrifugation pendant 10 min à 3700 trs/min, on obtient la solution SE équivalente à environ **80 µg/ml**.

Une fois l'injection des solutions est réalisée et à l'aide du logiciel, un rapport d'analyse est obtenu, contenant le chromatogramme et le tableau des résultats (identification du pic, temps de rétention, surface du pic, ...etc.).

Le titre est calculé par la même formule du dosage (§ 4.2.2).

Ces préparations sont répétées 9 fois, on obtient 10 échantillons.

**Norme :** Les comprimés ne satisfont pas à l'essai si le titre individuel en PA d'un comprimé sur 10 se trouve en dehors des limites de 15 % à 25 % de la moyenne des titres.

### 4.2.6. La sécabilité

La sécabilité est évaluée selon deux techniques :

#### - Détermination de la masse moyenne

30 demi-comprimés du médicament sont pesés individuellement. On détermine la masse moyenne selon un modèle statistique qui présente les valeurs Max, Min et moyenne puis on trace la courbe sécabilité selon les limites indiquées.

**Norme :** Les comprimés ne satisfont pas à l'essai si la masse individuelle d'un demi-comprimé se trouve en dehors des limites de 15 % à 25 % de la masse moyenne.

#### - Dosage du principe actif par HPLC lors de l'essai de sécabilité

L'essai est réalisé dans les mêmes conditions opératoires que le dosage du principe actif en utilisant la même solution standard (§4.2.2).

**Glimépiride comprimé 2 mg :** on divise un comprimé en deux moitiés, on ajoute 1 ml d'eau purifiée à une des deux moitiés du comprimé dans une fiole de 10 ml, on l'introduit au bain à ultrason pendant 2 min et QSP 10 ml avec l'acétonitrile à 80%. Après centrifugation pendant 10 min à 3700 trs/min, on obtient la solution SE équivalente à environ **100 µg/ml**.

**Glimépiride comprimé 4 mg :** on applique le même essai réalisé pour le demi comprimé de 2 mg, en remplaçant la fiole de 10 ml par une fiole de 20 ml.

Une fois l'injection des solutions est réalisée et à l'aide du logiciel, un rapport d'analyse est obtenu, contenant le chromatogramme et le tableau des résultats (identification du pic, temps de rétention, surface du pic, ...etc.).

Le titre est calculé par la même formule du dosage (§ 4.2.2).

Ces préparations sont répétées 9 fois, on obtient 10 échantillons.

**Norme :** Les comprimés ne satisfont pas à l'essai si le titre individuel en PA d'un demi-comprimé sur 10 se trouve en dehors des limites de 15 % à 25 % de la moyenne des titres.

### 4.2.7. Contrôle de qualité du conditionnement

Après la mise en blisters des comprimés, un contrôle de qualité du conditionnement est effectué par mesure de l'étanchéité du blister.

On submerge 10 blisters dans un bêcher, contenant de l'eau colorée par le bleu de méthylène, qu'on introduit dans un dessiccateur fermé sous vide. On applique une pression égale à 400 KPa pendant 1 minute ; les blisters sont retirés et séchés. On procède à une observation visuelle pour déterminer s'il y a pénétration de l'eau colorée à l'intérieur des blisters. Dans le cas où il y a apparition de quelques blisters non étanches, on refait l'essai pour 30 blisters. S'il y a apparition de plus de 6 blisters non étanches le résultat du test est non conforme.

## 5. Screening phytochimique

Ces essais consistent à réaliser des tests préliminaires sur la partie aérienne de la plante pour mettre en évidence la présence ou l'absence de certains principes bioactifs.

### 5.1. Tests préliminaires sur l'infusé

**Préparation de l'infusé à 10 % :** 10 g de la partie aérienne de plante en petits fragments dans 100 ml d'eau bouillante, on filtre après 15 min d'attente.

#### 5.1.1. Recherche des Tanins

Nous avons pris 5 ml de l'infusé, nous avons ajouté goutte à goutte 1ml d'une solution de chlorure ferrique ( $\text{Fe Cl}_3$ ) à 1% : l'apparition d'une coloration verdâtre indique la présence des Tanins catéchiques, bleu noirâtre : Tanins galliques.

A 30 ml de l'infusé, nous avons ajouté 15 ml de réactif de Stiasny (Formol à 30 % + HCl concentré 3-1v/v). Après chauffage de 30 mn au bain-marie, l'observation d'un précipité orange indique la présence des **Tanins catéchique (Bruneton, 1999)**.

#### 5.1.2. Recherche des Saponosides

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. 2 g de matériel végétal sec broyé à tester sont utilisés pour préparer une décoction avec 100 ml d'eau. On porte à ébullition pendant 30 min.

Après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à **100 ml**. A partir de cette solution mère, on prépare 10 tubes (1,3 cm de diamètre interne) avec 1, 2,.....10 ml, le volume final étant réajusté à **10 ml** avec de l'eau distillée.

Chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de **15 min** en position vertical, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm. Si elle est proche de **1 cm** dans le x tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante:

$$I = \frac{\text{Hauteur de mousse (en cm) dans le Xème tube} \times 5}{0,0x}$$

La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100 (**Bruneton, 1999**).

### 5.1.3. Recherche des Anthocyanes

La recherche des Anthocyanes repose sur le changement de la couleur de l'infusé à **10 %** avec le changement de pH. Nous avons ajouté à l'infusé quelques gouttes d'**HCl** pur et nous avons observé le changement de couleur, ensuite nous avons rajouté quelques gouttes de **NH<sub>4</sub>OH** ; Le changement de la couleur indique la présence des Anthocyanes (**Karumi et al, 2004**).

### 5.1.4. Recherche des Leuco-anthocyanes

Nous avons pris **5 ml** d'infusé, mêlé de **4 ml** d'alcool chlorhydrique (éthanol / HCl pur ; 3 à 1 v/v). Après un chauffage au bain-marie à **50°C** pendant quelques minutes : L'apparition d'une couleur rouge cerise indique la présence des Leuco-anthocyanes (**Karumi et al, 2004**).

## 5.2. Tests préliminaires sur la poudre

### 5.2.1. Recherche des Alcaloïdes

**5 g** de la plante séchée et broyée sont mélangé avec **50 ml** d'**HCl** à **1 %** dans un récipient. Après une macération, nous avons filtré le mélange et additionné au filtrat quelques gouttes de réactif de Mayer : L'apparition d'un précipité blanc indique leur présence (**Bruneton, 1999 ; Karumi et al, 2004**).

### 5.2.2. Recherche des Flavonoïdes

**10 g** de drogue pulvérisée sont macéré dans **150 ml** d'**HCl** à **1 %** pendant **24h**, après avoir filtré le mélange, nous avons procédé au test suivant: nous avons pris **10 ml** du Filtrat, après avoir rendu basique par l'ajout du **NH<sub>4</sub>OH**, après **3h**; L'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube indique la présence des Flavonoïdes (Bruneton, 1999).

### 5.2.3. Recherche des Cardinolides

**1 g** de poudre sèche est macéré dans **20 ml** d'eau distillée pendant **3h** après avoir filtré le mélange, on prélève **10 ml** du filtrat l'extraire avec un mélange de **10 ml** de **CHCl<sub>3</sub>** et de **C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH**, on évapore la phase organique dans un bain de sable à **90° C**, après, le précipité est dissout dans **3 ml** de **CH<sub>3</sub>COOH** glacial, on ajoute quelques gouttes de **FeCl<sub>3</sub>** suivi de **1 ml** d'**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** concentré sur les parois du tube : L'apparition d'une couleur vert bleu dans la phase acide indique la présence des Cardinolides (Bruneton, 1999).

### 5.2.4. Recherche des Terpènes et des Stérols

**5 g** de poudre sont macéré dans **20 ml** d'éther de pétrole, après avoir filtré évaporer la phase organique dans un bain de sable **T=90 C°** le résidu est dissout dans **0.5 ml** d'acide acétique en ajoutant **1 ml** d'**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** concentré : Dans la zone de contact entre les deux liquides un cercle violé ou marron puis devient gris indique la présence des Stérols et Terpènes (Bruneton, 1999).

## 6. Etude biologique

Nous avons évalué les effets antidiabétiques des deux médicaments, l'Amarel et le générique, ainsi qu'une combinaison du générique avec un extrait de plante sur des rats Wistar albinos, rendus diabétiques à l'alloxane.

Pour les deux médicaments, les lots qui ont été utilisés dans l'analyse de contrôle de la qualité sont les mêmes lots administrés aux rats.

### 6.1. Préparation de l'extrait de plante

Après récolte et sélection des parties aériennes, ces dernières ont été lavées, séchées dans l'étuve puis broyées et conservées à l'abri de l'humidité dans des boîtes hermétiques jusqu'au moment de son utilisation.



L'extrait aqueux est préparé par décoction pendant 10 min des parties aériennes de la plante, dont la dose administrée est calculée par rapport au poids corporel des rats, à une dose de 80 mg/kg de poids corporel ; les rats ont été pesés chaque jour pour s'assurer de la posologie.

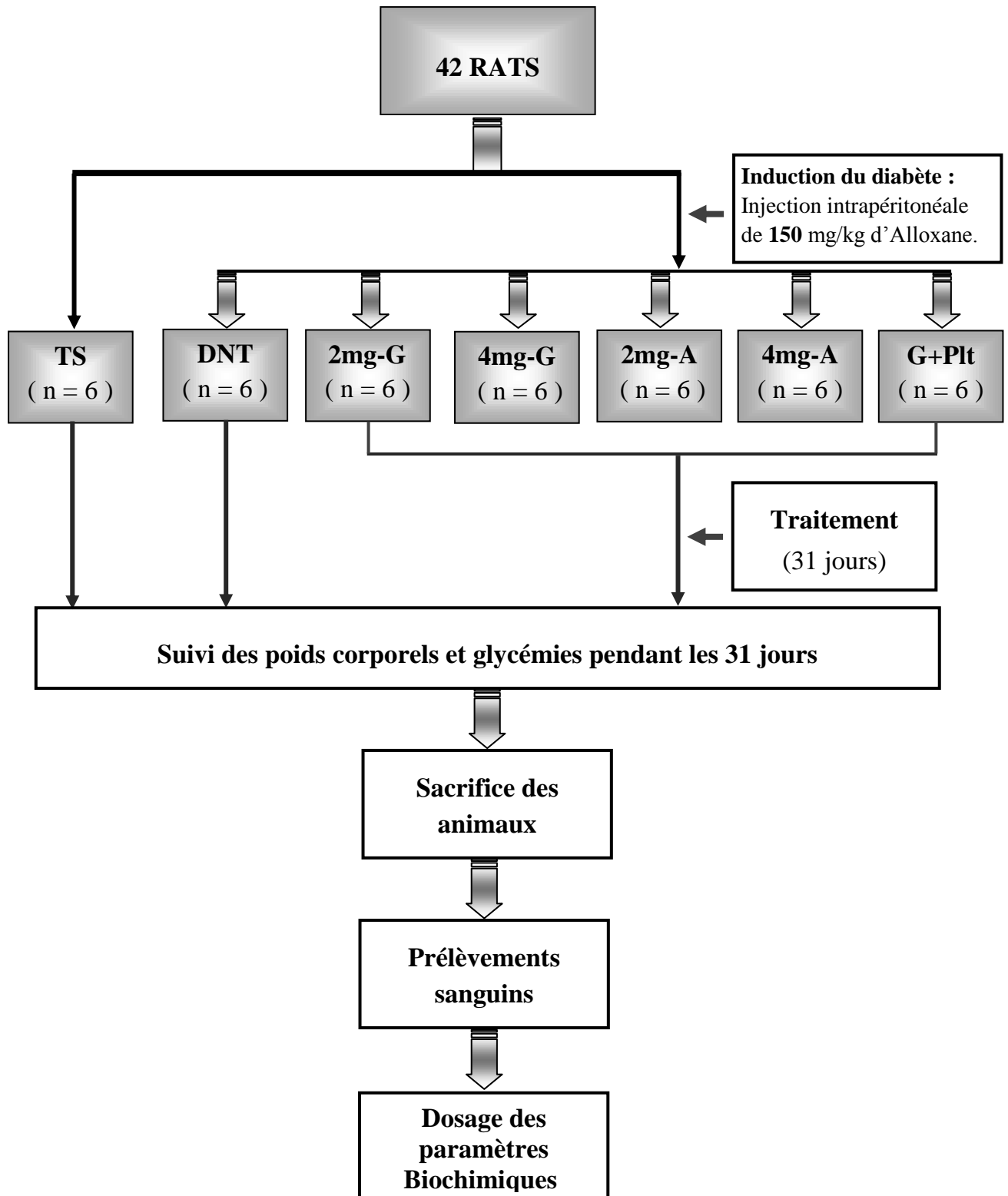
### 6.2. Induction du diabète

Les rats ont été traités par injection intrapéritonéale de **150 mg/kg** de poids corporel d'alloxane (**Matteucci & Giampietro, 2008**). Pour s'assurer de l'installation du diabète, nous avons mesuré les glycémies des rats après **72** heures de l'injection d'alloxane; les rats présentant une glycémie supérieure à **300 mg/dl** sont considérés comme diabétiques et sont retenus pour la suite de l'étude (**Eidi & Eidi, 2009**).

### 6.3. Traitement des animaux

Les rats ont été repartis en 7 lots de **6** rats selon la **figure 8** : deux lots témoins (sain et diabétique non traité); 4 lots traités par 2 et 4 mg des deux médicaments et un lot traité par 2 mg du générique supplémenté par une dose d'un extrait aqueux d'une plante antidiabétique selon la médecine traditionnelle locale.

Les traitements ont été administrés aux rats par voie orale quotidiennement à l'aide d'une seringue, les doses ont été uniques, pendant 31 jours.



**TS** : Témoins Sains; **DNT** : Diabétiques Non Traités; **2 mg-G** : Diabétiques Traités par 2 mg/kg p.c. du générique; **4 mg-G** : Diabétiques Traités par 4 mg/kg p.c. du générique ; **2 mg-A** : Diabétiques Traités par 2 mg/kg p.c. de l'Amarel; **4 mg-G** : Diabétiques Traités par 4 mg/kg p.c. de l'Amarel; **G+Plt** : Diabétiques Traités par le générique à 2mg/kg p.c. le matin et le soir par l'extrait aqueux de la plante à 80 mg/kg p.c.

**Fig. 8 : Protocole expérimental de l'étude biologique.**

### 6.4. Suivi des animaux pendant la période du traitement

Poids corporel : On a effectué un suivi des rats par mesure des poids corporels chaque jour grâce à une balance KERN.

Mesure de la glycémie : La glycémie est mesurée à jeun, chaque deux 2 jours, à l'aide des bandelettes réactives (ACCU-CHEK) et un glucomètre Accu-Chek à partir d'une goutte de sang prélevée au niveau de la veine de la queue de l'animal. Les résultats sont exprimés en termes de milligramme par décilitre de sang.

### 6.5. Sacrifice et prélèvements

#### 6.5.1. Sacrifice des rats

Après 31 jours d'expérimentation, les rats ont été sacrifiés le matin à jeun, par décapitation à l'aide d'une lame bistouri stérile selon les règlements d'éthique dans le *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (**National Research Council, 2010**).

#### 6.5.2. Prélèvement sanguin

Après décapitation, le sang est immédiatement recueilli dans des tubes polyéthylènes étiquetés. Selon les analyses à effectuer, nous avons utilisés des tubes appropriés pour le dosage des différents paramètres sanguins.

Après centrifugation à 5000 tours/min pendant 15 minutes, les sérums obtenus ont été stockés au congélateur à -20°C jusqu'à l'analyse. Le sang total des tubes à EDTA a été immédiatement utilisé pour doser l'HbA 1C.

### 6.6. Dosage des paramètres biochimiques

Le dosage des paramètres biochimiques a été effectué selon les fiches techniques des Kits Spinreact.

#### 6.6.1. Dosage de la glycémie et de l'HbA1c

##### - Glycémie

- **Principe** : le glucose est oxydé sous l'action de la glucose-oxydase (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), ce dernier, en présence de peroxyde (POD) oxyde le phénol et le 4-aminophénasone (chromogène incolore) pour former le quinonéimine, un composé coloré en rouge violet (**Barham & Trinder, 1972**) selon les réactions suivantes :



(Voir les détails en Annexe 1)

- **HbA1c** : le dosage de l'hémoglobine glyquée a été réalisé par un automate sur le sang total par la méthode immuno-turbidimétrie en utilisant un kit Spinreact.

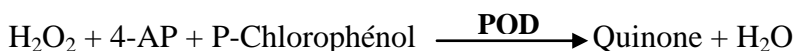
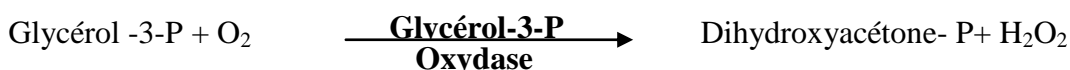
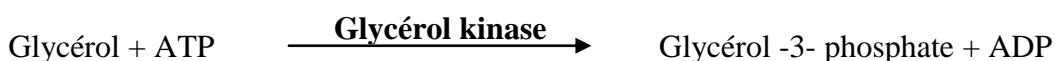
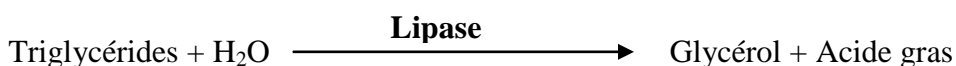
#### 6.6.2. Lipides totaux

- **Principe** : Les lipides totaux forment avec le phosphovainille et en présence de l'acide sulfurique un complexe coloré, l'intensité de sa couleur est proportionnelle à la concentration des lipides totaux dans les échantillons (Rifai *et al.*, 1999).

(Voir les détails en Annexe 1)

#### 6.6.3. Dosage des triglycérides

- **Principe** : Les triglycérides sont déterminés après une hydrolyse enzymatique par les lipoprotéines lipase (LPL). L'indicateur est une quinone formé à partir de l'hydrogène-peroxyde, le 4-aminophénazone (4-AP) et le P-chlorophénol sous l'influence catalytique de la peroxydase (POD) (Fassati & Prencipe, 1982) ; selon les quatre réactions suivantes :

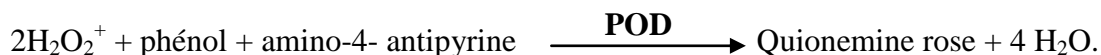


(Voir les détails en Annexe 1)

#### 6.6.4. Dosage du Cholestérol total

- **Principe** : Après hydrolyse enzymatique puis oxydation, l'indicateur quinoneimine formé à partir du peroxyde d'hydrogène et du amino-4-antipyrine en présence du phénol et de peroxydase permet la quantification du cholestérol (Rifai *et al.*, 1982), selon la réaction suivante :





La quantité de quionemine formée est proportionnelle à la concentration de cholestérol.

(Voir les détails en Annexe 1)

#### 6.6.5. Dosage des HDLc

- **Principe :** Les VLDL (Very Low Density Lipoproteins) et les LDL (Low Density Lipoproteins) sériques ou plasmatiques sont précipités par le phosphotungstate en présence des ions de magnésium. Après élimination par centrifugation du précipité, le supernageant est utilisé pour la détermination de l'HDL cholestérol (High Density Lipoproteins) (Grove, 1979).

(Voir les détails en Annexe 1)

#### 6.6.6. Dosage des LDLc

La formule de **Friedewald (1972)** permet de calculer le taux LDLc selon la réaction suivante :

$$\text{LDLc} = \text{TC} - ((\text{TG}/5) + \text{HDLc})$$

**TC :** total cholestérol, **TG :** triglycérides, **LDLc :** low density lipoprotein cholestérol.

#### 6.6.7. Protéines totales

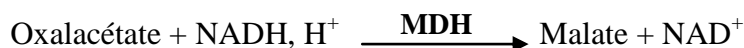
- **Principe :** Les liaisons peptidiques réagissent avec les sulfates de cuivre en milieu alcalin formant une coloration violette (bleu-violet) dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'échantillon (Koller, 1984)

(Voir les détails en Annexe 1)

#### 6.6.8. Dosage de l'aspartate aminotransférase (AST/TGO)

- **Principe :** L'aspartate aminotransférase (AST) appelée aussi le glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine de l'aspartate au  $\alpha$ -cétoglutarate formant ainsi le glutamate et l'oxalacétate. L'oxalacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH (Murray, 1984).



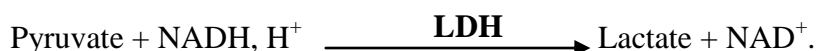


Le taux de diminution de la concentration en NADH, mesuré par spectrophotométrie, est proportionnel à l'activité de l'AST présente dans l'échantillon.

(Voir les détails en Annexe 1)

#### 6.6.9. Dosage de l'alanine aminotransférase (ALT/TGP)

- **Principe :** L'alanine aminotransférase (ALT) ou le glutamate pyruvate transaminase (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine de l'alanine au  $\alpha$ -cétooglutarate formant ainsi le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate est réduit au lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) et le NADH (Murray, 1984) :

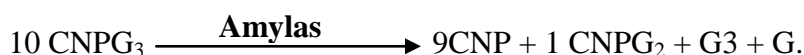


Le taux de diminution de la concentration en NADH, mesuré par spectrophotométrie, est proportionnel à l'activité de l'alanine aminotransférase présente dans l'échantillon.

(Voir les détails en Annexe 1)

#### 6.6.10. Dosage des $\alpha$ amylases

- **Principe :** L' $\alpha$ -amylase hydrolyse le 2-chloro-4-nitrophényl- $\alpha$ -D-maltoïroside (CNPG3) en 2-chloro-4-nitrophénol (CNP), 2-chloro-4-nitrophényl- $\alpha$ -D-maltoside (CNPG2), maltotriose (G3) et glucose (G) selon la réaction suivante :



Le taux de formation du 2-chloro-4-nitrophénol, mesuré par spectrophotométrie, est proportionnel à la concentration catalytique des  $\alpha$  amylases présente dans l'échantillon (Neumann, 1984).

(Voir les détails en Annexe 1)

#### 6.6.11. Dosage des lipases

- **Principe :** La lipase pancréatique en présence de colipase, désoxycholate et les ions de calcium, hydrolyse le substrat 1-2-O-dilauryl-rac-glycéro-3-glutate-(6'-méthylrésorufine)-ester. La séquence de réactions qui sont impliquées dans la détermination enzymatique directe de la lipase, sont les suivantes (Neumann, 1984) :

1-2-O-dilauryl-rac-glycéro-3-glutate-(6'-méthylrésorufine)-ester  $\xrightarrow{\text{Lipase}}$  1-2-O-dilauryl-rac-glycérol + Glutarique-6'-méthylrésorufine-ester (non stable)  $\xrightarrow{\text{OH}^-}$  Acide glutarique + Méthylrésorufine.

Le taux de formation du méthylrésorufine, mesuré par spectrophotométrie, est proportionnel à la concentration catalytique de la lipase présente dans l'échantillon.

(Voir les détails en Annexe 1)

### 6.6.12. Dosage de la créatinine

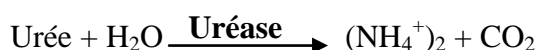
- **Principe :** L'essai est basé sur la réaction de la créatinine avec les picrates de sodium. La créatinine réagit avec le picrate alcalin pour donner un complexe coloré, l'intervalle du temps choisi pour les dosages évite les interférences avec les autres constituants du sérum (**Tietz, 1990**).

L'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la concentration en créatinine de l'échantillon.

(Voir les détails en Annexe 1)

### 6.6.13. Dosage de l'urée

- **Principe :** L'uréase hydrolyse l'urée en ammoniacque ( $\text{NH}_4^+$ ) et dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ). Les ions d'ammoniacque réagissent avec le Salicylate et l'hypochlorite ( $\text{NaClO}$ ), en présence du Nitroprusside pour former un indophénol vert (**Kaplan, 1984**), selon les réactions ci-dessous :



L'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la concentration d'Urée dans l'échantillon.

(Voir les détails en Annexe 1)

### 6.6.14. Dosage de l'acide urique

- **Principe :** L'acide urique est oxydé par l'uricase pour donner l'allantoïne et le peroxyde d'hydrogène ( $2 \text{H}_2\text{O}_2$ ), ce dernier forme, sous l'influence du POD, du 4-

aminophénazone (4-AP) et 2-4 Dichlorophénol sulfonate (DCPS), un composé rouge de quinoneimine (Fassati *et al*, 1980).



L'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la concentration d'acide urique dans l'échantillon.

(Voir les détails en Annexe 1)

### 6.7. Traitement statistique des résultats

Les résultats ont été présentés sous forme de moyennes plus ou moins l'écart type de la moyenne (Moy  $\pm$  SEM). L'analyse statistique des données a été réalisée par l'analyse de la variance suivie par le test de Tukey pour les comparaisons deux à deux et Dunnet pour les comparaisons avec un contrôle en utilisant un logiciel MINITAB (version 16).

Les différences sont considérées comme :

**\* : Significatif lorsque ( $P \leq 0,05$ ).**

**\*\* : Hautement significative lorsque ( $P \leq 0,01$ ).**

**\*\*\* : Très hautement significative lorsque ( $P \leq 0,001$ ).**

**P: la prévalence.**



*RESULTS*  
*ET DISCUSSION*

## RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. Etude physicochimique

#### 1.1. Etude physicochimique de la matière première

Les résultats de l'analyse de la matière première sont présentés sur le **Tableau III**.

**Tableau III: Résultats du contrôle de la qualité de la matière première**

Analyse	Unité	Résultat	Norme
<b>Caractère :</b> Aspect et solubilité	-	Conforme	Poudre blanche ou sensiblement blanche, inodore, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans le diméthylformamide, peu soluble dans le chlorure de méthylène et très peu soluble dans le méthanol.
<b>Identification (IR)</b>	-	Positif	Positif
Titre en Glimépiride	%	98,80	97,0 à 102,0
<b>Essai physicochimique</b>			
Teneur en eau	%	0,055	$\leq 0,5$
Cendres sulfuriques	%	0,04	$\leq 0,1$

##### 1.1.1. Aspect et solubilité

L'aspect et la solubilité de la poudre est conforme aux normes de la pharmacopée européenne, la matière est blanche, inodore ; la solubilité de la matière première est présentée sur le **Tableau IV**.

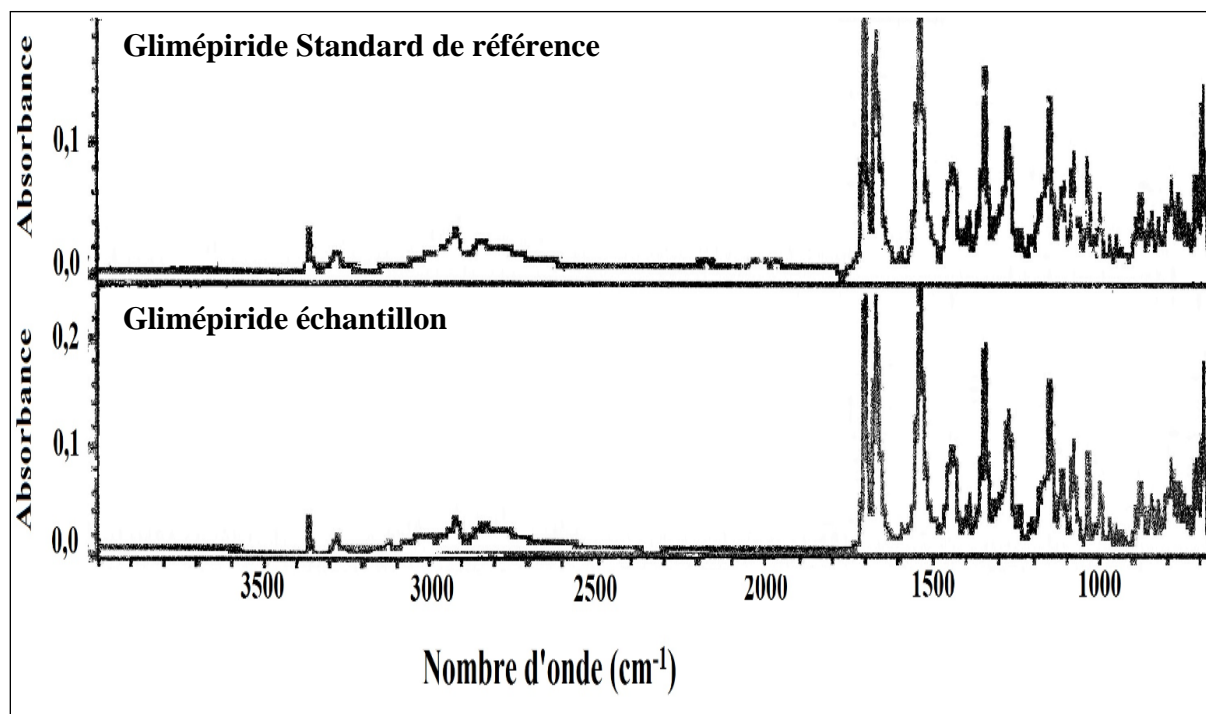
**Tableau IV: Solubilité de la matière première Glimépiride dans les différentes solutions**

<b>Solutions</b> <b>Echantillon</b>	<b>Eau</b>	<b>DMF</b>	<b>Chlorure de méthylène</b>	<b>Méthanol</b>
Matière première (Glimépride)	Insoluble	Soluble	Peu soluble	Très peu soluble

##### 1.1.2. Identification par infrarouge

Après analyse par spectroscopie infrarouge du standard et de l'échantillon, les spectres obtenus ont été comparé (**Fig. 9**).

Les spectres infrarouges de la matière première et du glimépiride standard de référence sont similaires à celui de la molécule de référence, Les différents groupements du glimépiride ( $C=O$ ,  $SO_2$ ,  $NH$ ,  $C=C$  aromatiques) apparaissent dans les deux spectres, ce qui prouve l'existence du glimépiride dans la matière première.



**Fig. 9 : Spectres infrarouge du standard de référence et la matière première.**

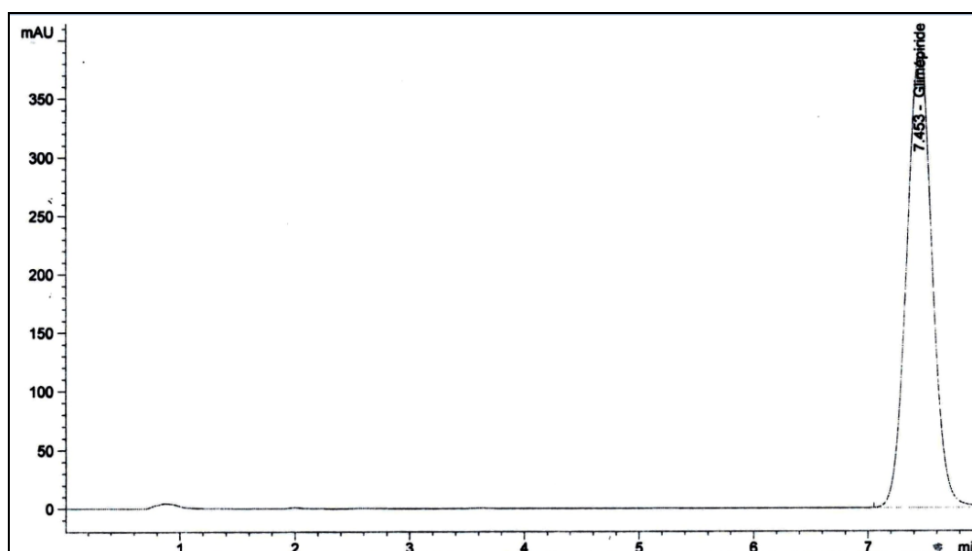
### 1.1.3. Dosage par *HPLC*

L'analyse de la matière première Glimépiride ainsi que le standard de référence a donné des résultats comparables (**Fig. 10 et 11**).

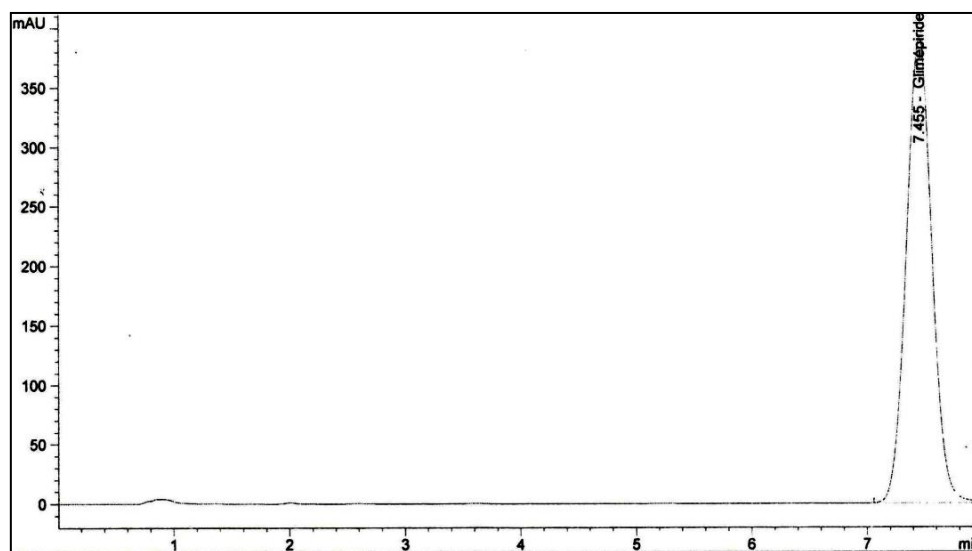
Le temps de rétention est de 7,453 min pour le standard et 7,455 min pour l'échantillon, le titre en glimépiride obtenu est de 98,80 %.

Ce résultat montrerait que la matière première utilisée pour la fabrication de ce médicament est de bonne qualité ; elle est pure à 98,80 % comparé au standard de référence dont la pureté est de 99 % ; le reste représente des impuretés.

Ce résultat obtenu est conforme aux normes de la pharmacopée européenne qui préconise que la pureté de la matière première doit être comprise entre 97,0 et 102,0 % (**Ph. Eu., 2011**).



**Fig. 10: Chromatogramme HPLC du standard de référence glimépiride.**



**Fig. 11: Chromatogramme HPLC de la matière première Glimépiride.**

### 1.1.4. Teneur en eau

Le résultat obtenu (0,055%) est inférieure à la valeur maximale recommandée par la pharmacopée européenne (0,5%) (**ph. Eu., 2011**); cette faible teneur en eau, permet à la matière première d'avoir une qualité et une stabilité durant le stockage. La présence d'eau dans les poudres est un facteur favorisant leur dégradation aussi bien chimique que microbienne (**Giron, 1988**).

### 1.1.5. Les cendres sulfuriques

Le résultat obtenu (0,04%) est inférieur à la valeur maximale recommandée par la pharmacopée européenne (0,1%); cette valeur obtenue, signifierait que les substances inorganiques contenues dans la matière première sont négligeables (**ph. Eu., 2011**).

## 1.2. Etude physicochimique du produit fini

Le **Tableau V** montre les résultats de l'analyse physicochimique du produit fini du générique et du princeps.

**Tableau V : Contrôle de la qualité des produits finis.**

Analyse	Unité	Amarel	Générique	Norme (USP)
<b>Inspection</b>	-	Conforme	Conforme	Absence de défaut
<b>Caractère Aspect</b>	-	NA	Conforme	Comprimé ovale, sécable 10 x 5 mm, pelliculé de couleur verte (cp de 2 mg) ou bleu (cp de 4 mg)
ID du Glimépiride par HPLC	-	Positif	Positif	Positif
Titre du Glimépiride (cp 2 mg)	%	107,2	106,9	De 90,0 à 110,0
Titre du Glimépiride (cp 4 mg)	%	109,8	107,0	De 90,0 à 110,0
Titre du Glimépiride (cp 2 mg)	mg/cp	2,14	2,14	De 1,80 à 2,20
Titre du Glimépiride (cp 4 mg)	mg/cp	3,39	4,40	De 3,60 à 4,40
<b>Essai Physico-chimie (cp 2 mg)</b>				
Etanchéité	-	Conforme	Conforme	Etanche
Uniformité de masse	%	Conforme	Conforme	Limites 7,5-15
Uniformité de masse : Masse Min	mg	134,33	174,93	
Uniformité de masse : Masse Moy	mg	135,82	177,28	
Uniformité de masse : Masse Max	mg	137,12	180,17	
Sécabilité	%	Conforme	Conforme	Limites 15 - 25
Uniformité de masse : Masse Min		66,33	88,66	
Uniformité de masse : Masse Moy		68,43	91,53	
Uniformité de masse : Masse Max		70,95	93,02	
Temps de désintégration	Min	3	1	Inférieure ou égale à 15
Dissolution après 15 min	%	98,4	82,7	Supérieure ou égale à 80
<b>Essai Physico-chimie (cp 4 mg)</b>				
Etanchéité	-	Conforme	Conforme	Etanche
Uniformité de masse	%	Conforme	Conforme	Limites 7,5-15
Uniformité de masse : Masse Min	mg	133,95	172,28	
Uniformité de masse : Masse Moy	mg	136,15	175,76	
Uniformité de masse : Masse Max	mg	138,17	178,14	
Sécabilité	%	Conforme	Conforme	Limites 15 - 25
Uniformité de masse : Masse Min	mg	66,78	89,60	
Uniformité de masse : Masse Moy	mg	69,37	91,61	
Uniformité de masse : Masse Max	mg	72,63	92,60	
Temps de désintégration	min	3	1	Inférieure ou égale à 15
Dissolution après 15 min	%	99,6	99	Supérieure ou égale à 80

**USP:** United States pharmacopeia, **ND** : Non disponible, **NA** : Non applicable.

### 1.2.1. Aspect du comprimé

Selon la définition du médicament générique, la forme et la couleur du comprimé peut différer de son princeps (**Tisserville, 1983; Antognini, 1987**), le contrôle de l'aspect des comprimés du générique analysé doit correspondre au dossier technique interne de l'industrie ; ce critère n'est pas comparable entre l'Amarel et son générique. Pour notre échantillon, les comprimés du générique répondent aux critères cités précédemment.

### 1.2.2. Dosage par HPLC

Les résultats de l'analyse par HPLC des produits finis Amarel et son générique à 2 et 4 mg comparés au standard de référence sont présentés dans les figures **12, 13, 14** (pour la dose 2 mg) et les figures **15, 16, 17** (pour la dose 4 mg).

Les temps de rétention obtenus pour les produits finis Amarel et son générique à 2 mg sont de 7,063 min et 7,052 min par rapport au standard de référence (7,054 min) (**Fig. 12, 13, 14**); le titre en glimépiride obtenu est de 107,2 % pour l'Amarel et 106,9 % pour le générique.

Les temps de rétention obtenus pour les produits finis Amarel et son générique à 4 mg sont de 7,390 min et 7,446 min par rapport au standard de référence (7,455 min) (**Fig. 15, 16, 17**); le titre en glimépiride obtenu est de 109,8 % pour l'Amarel et 107,0 % pour le générique.

Ces résultats montreraient que les produits finis génériques (2 et 4 mg) sont de bonne qualité du point de vue physicochimique; comparés au princeps Amarel ainsi qu'au standard de référence utilisé dont la pureté est de 99 %.

L'Amarel a montré un titre en principe actif supérieur à celui du générique pour les deux posologies (2 et 4 mg), mais ces résultats sont conformes aux normes de la pharmacopée américaine qui préconise que la pureté du produit fini Glimépiride doit être compris entre 90,0 et 110,0 %.

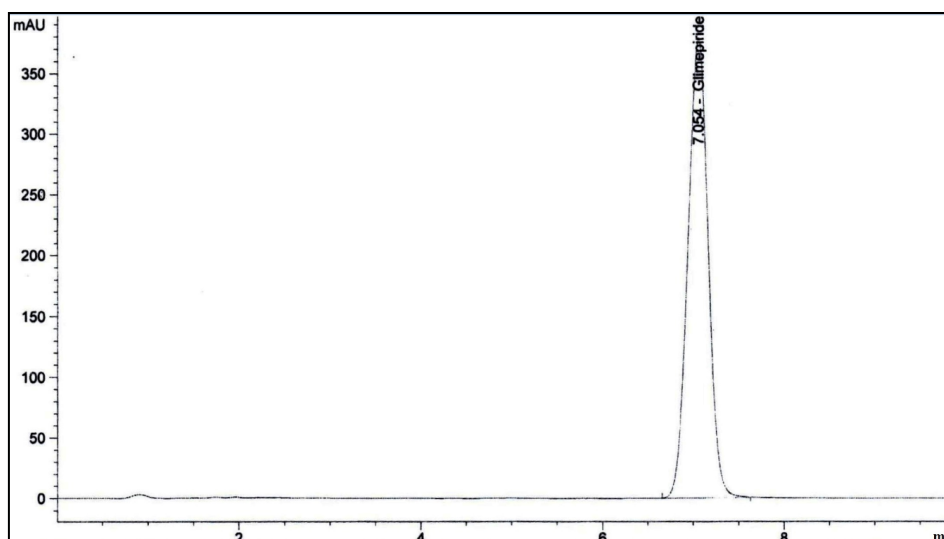


Fig. 12: Chromatogramme HPLC du standard de référence glimépiride.

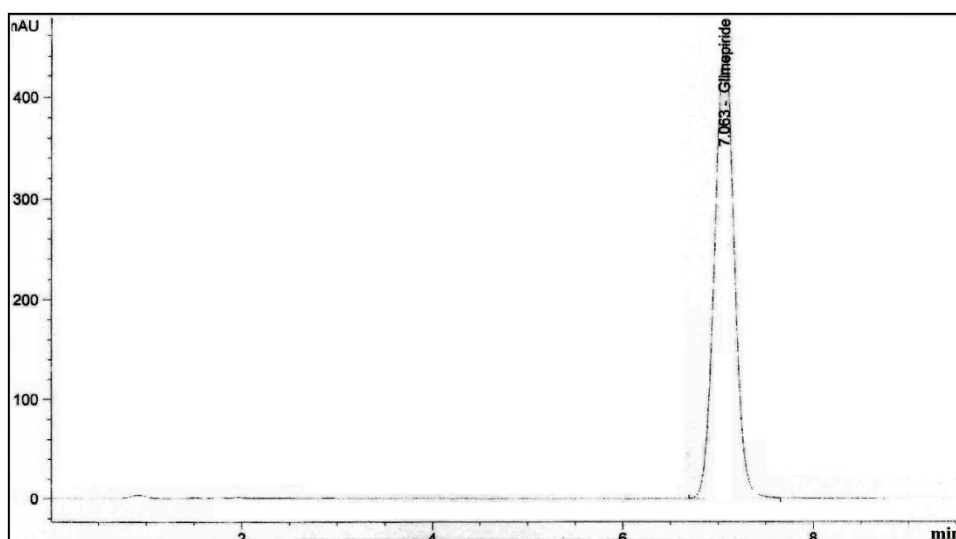


Fig. 13: Chromatogramme HPLC de l'Amarel 2 mg.

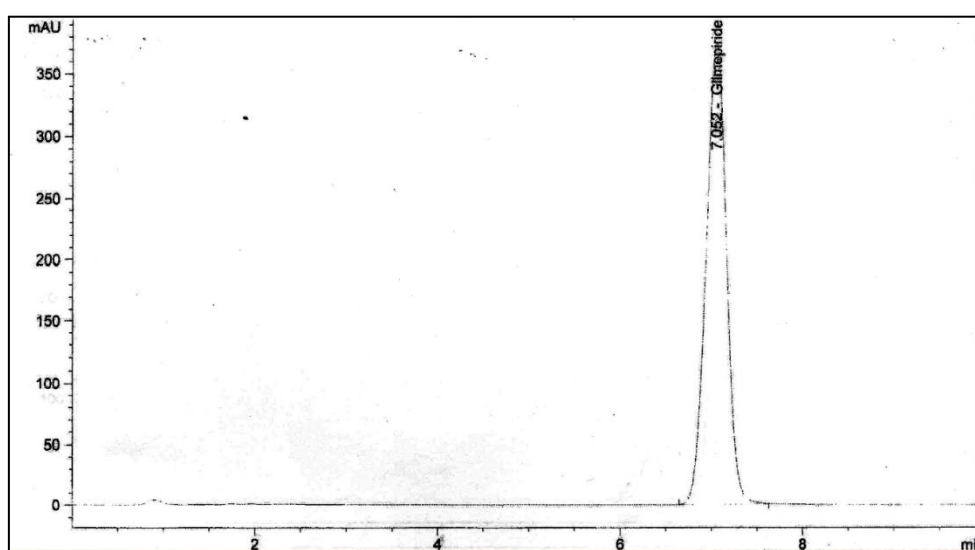
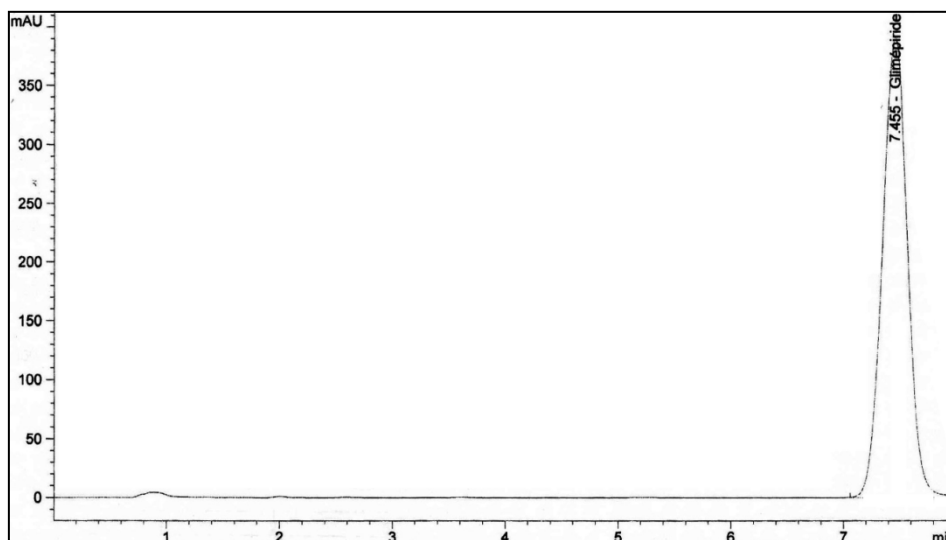
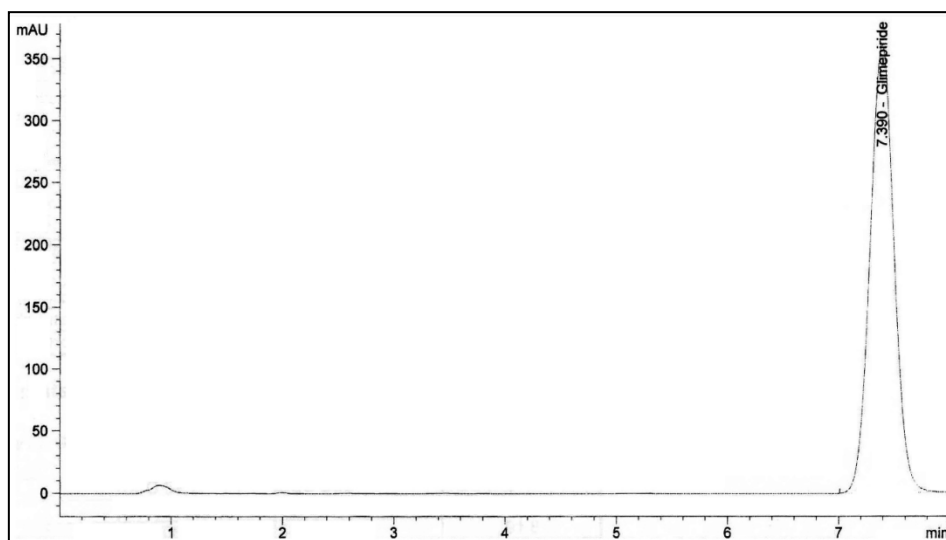


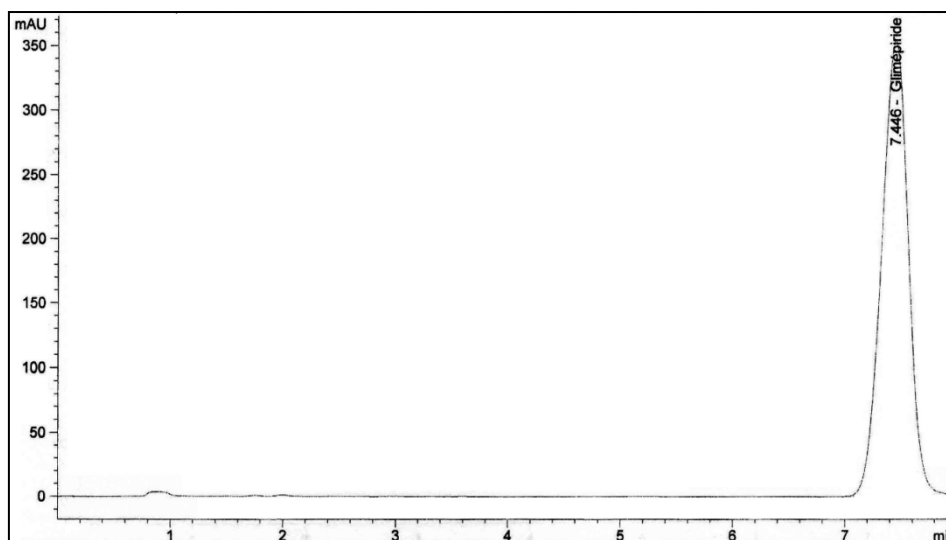
Fig. 14: Chromatogramme HPLC du générique Glimépiride 2 mg.



**Fig. 15: Chromatogramme HPLC du standard de référence glimépiride.**



**Fig. 16: Chromatogramme HPLC de l'Amarel 4 mg.**



**Fig. 17: Chromatogramme HPLC du générique Glimépiride 4 mg.**



### 1.2.3. L'essai de la dissolution

Tous les échantillons ont montré des pourcentages de dissolution conformes aux normes (**supérieur ou égale à 80%**) de la pharmacopée américaine (**USP, 2012**), l'Amarel à différentes posologies a donné un résultat supérieur à celui obtenu par le générique.

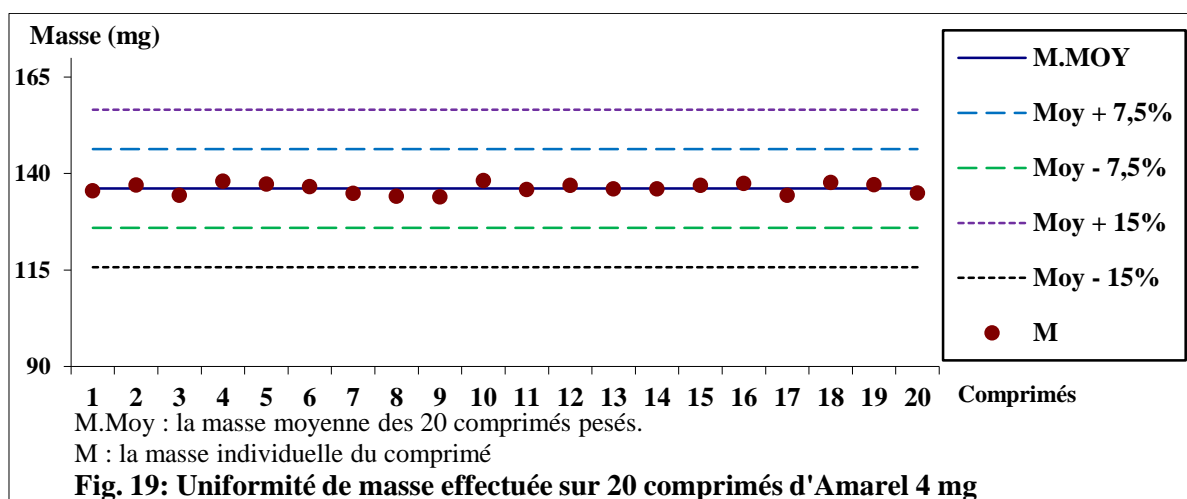
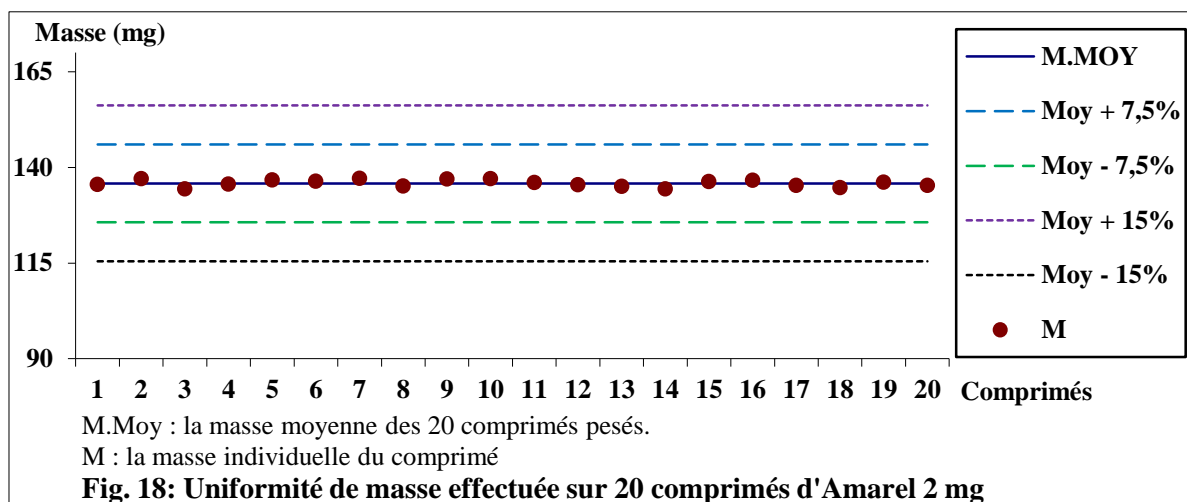
### 1.2.4. Le temps de désintégration

Tous les échantillons ont montré des temps de désintégration conformes aux normes (**inférieur ou égale à 15 min**) de la pharmacopée américaine (**USP, 2012**), l'Amarel à différentes posologies a donné un temps plus lent pour se désintégrer, supérieur à celui obtenu par le générique à différentes doses.

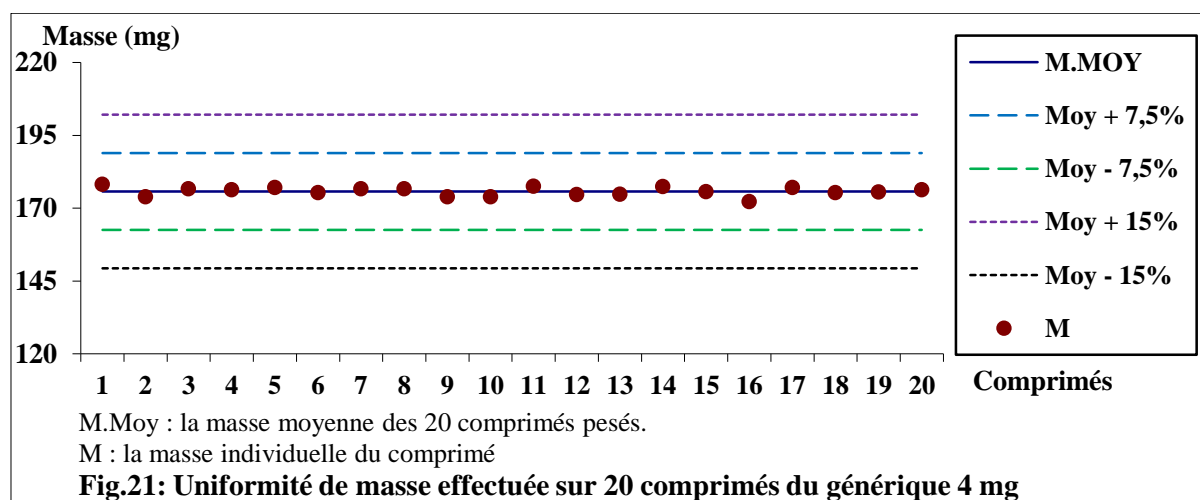
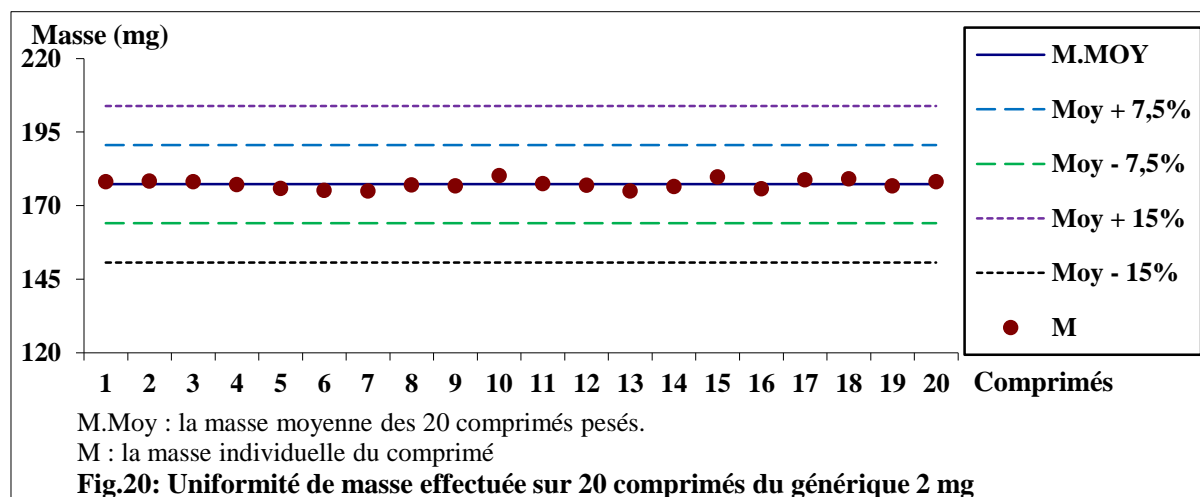
### 1.2.5. L'uniformité de masse

#### - L'uniformité de masse effectuée par pesée de 20 comprimés

Au maximum, la masse individuelle de 2 comprimés sur les 20 unités peut s'écarter de la masse moyenne à plus de 7,5 %, mais aucun comprimé ne doit montrer une masse supérieure à 15% de la masse moyenne.

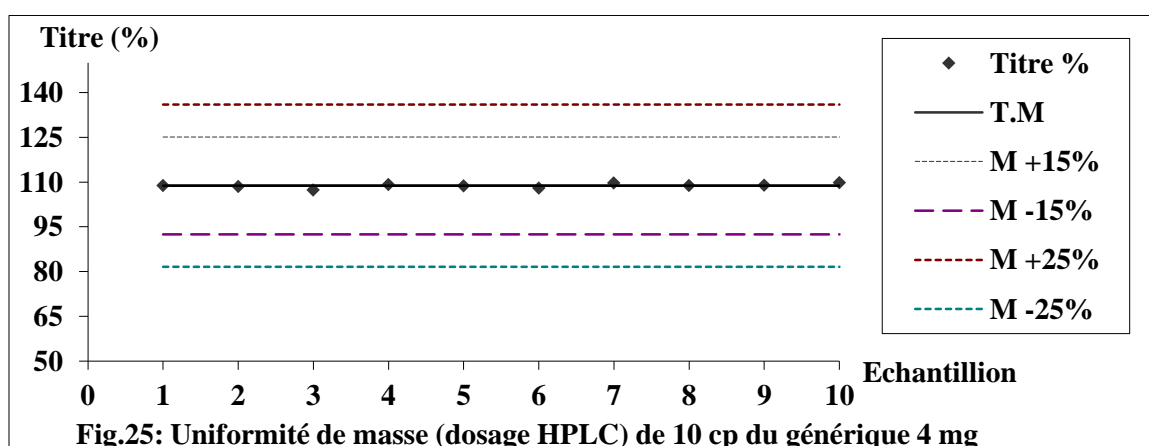
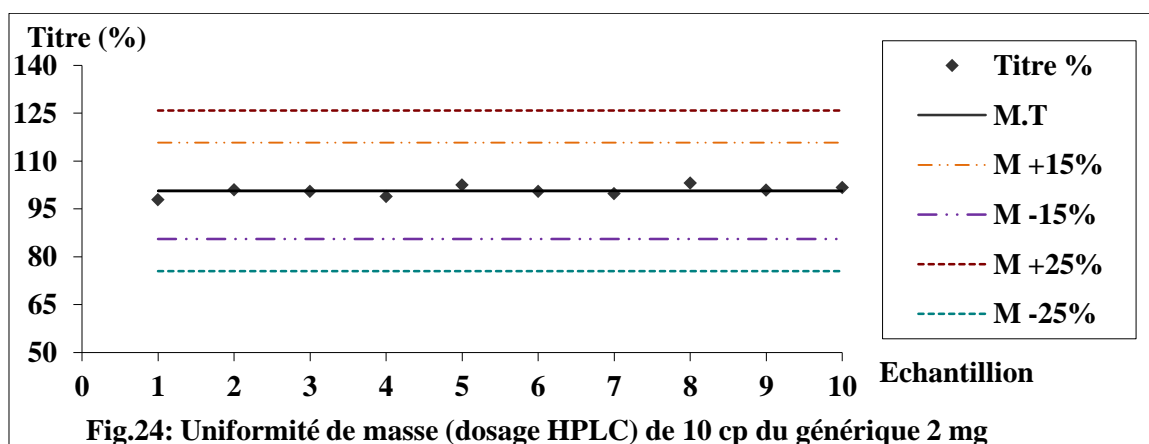
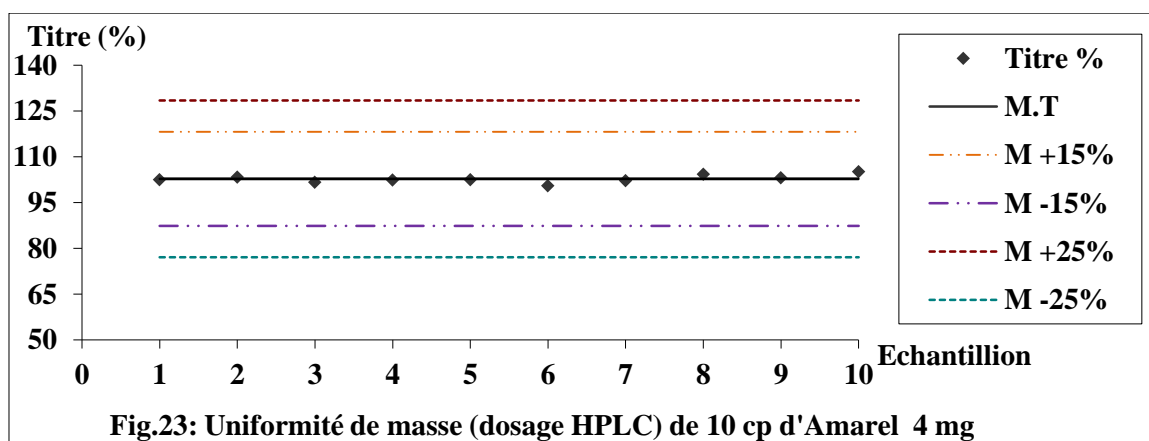
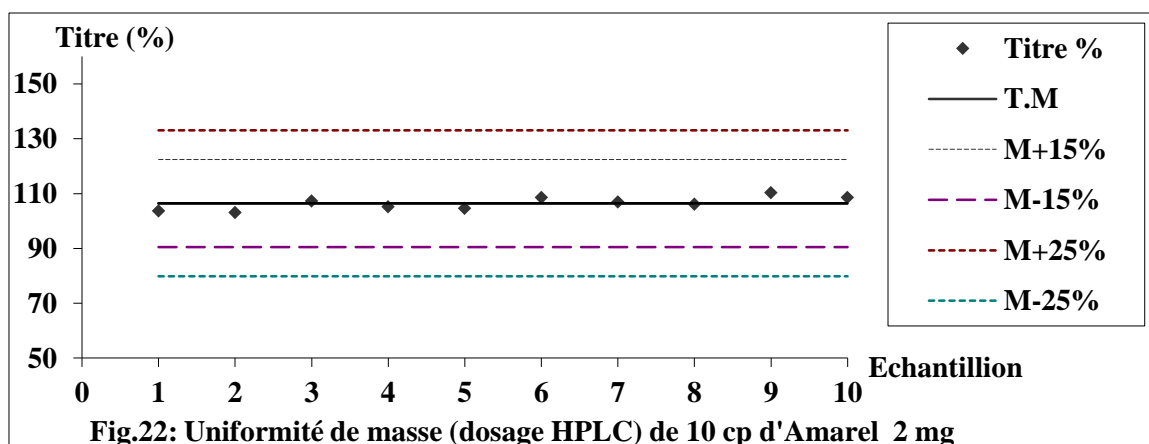


Les résultats obtenus pour tous le test d'uniformité de masse réalisé par pesée de 20 comprimés (générique 2 et 4 mg ; Amarel 2 et 4 mg) sont proches de leurs masses moyennes, aucun comprimé ne montre un écart supérieur à 7,5% de la masse moyenne des comprimés testés de chaque échantillon (Fig. 18, 19, 20 et 21).



### - Dosage HPLC d'uniformité de teneur lors de l'essai d'uniformité de masse

Les résultats obtenus pour le test d'uniformité de teneur par HPLC de tous les échantillons (générique 2 et 4 mg ; Amarel 2 et 4 mg) sont proches de leurs moyennes de titre ; aucun comprimé ne montre un titre en dehors des limites 15% et 25 % de la moyenne des titres des 10 comprimés testés de chaque échantillon (Fig. 22, 23, 24 et 25).

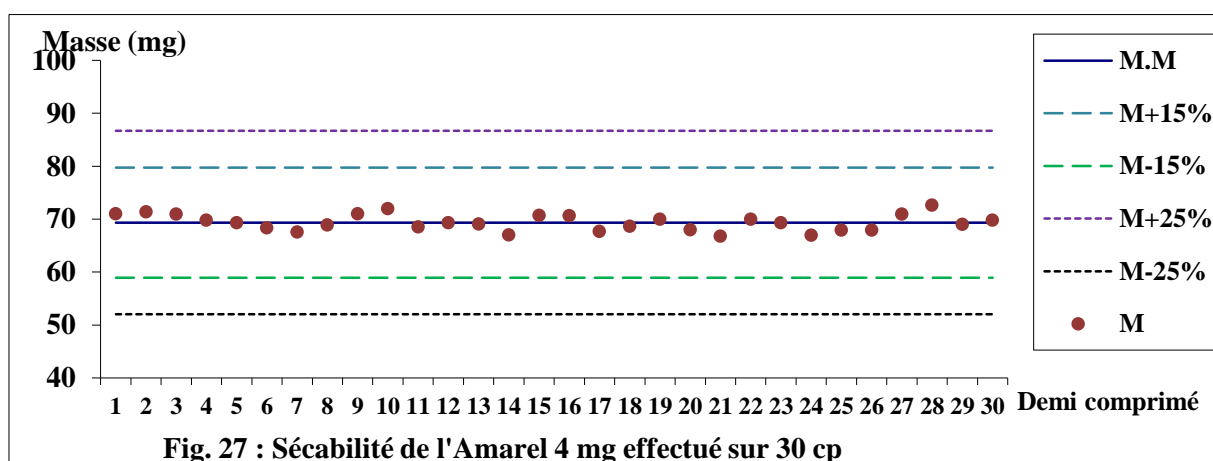
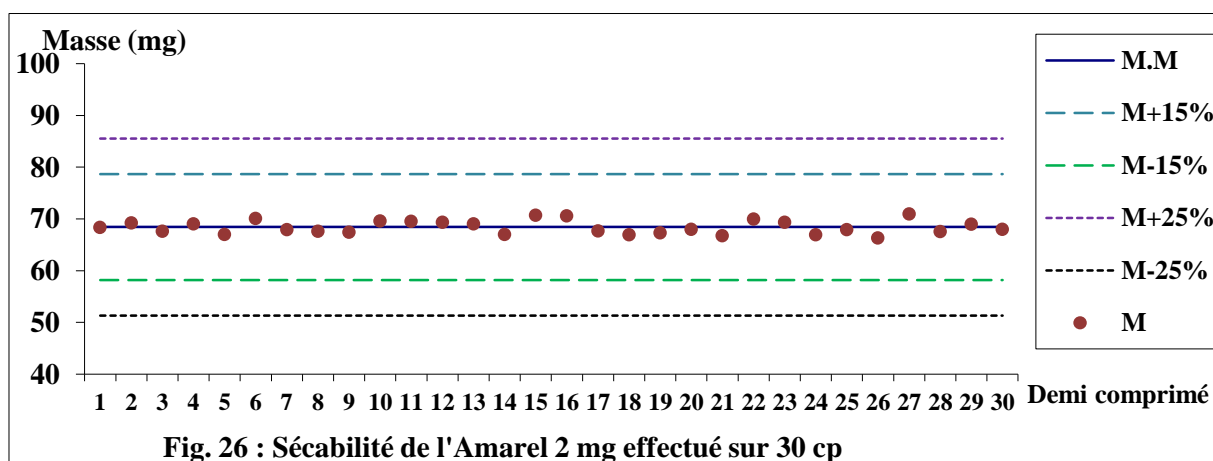


T : le titre en glimépiride en %, M : la moyenne.

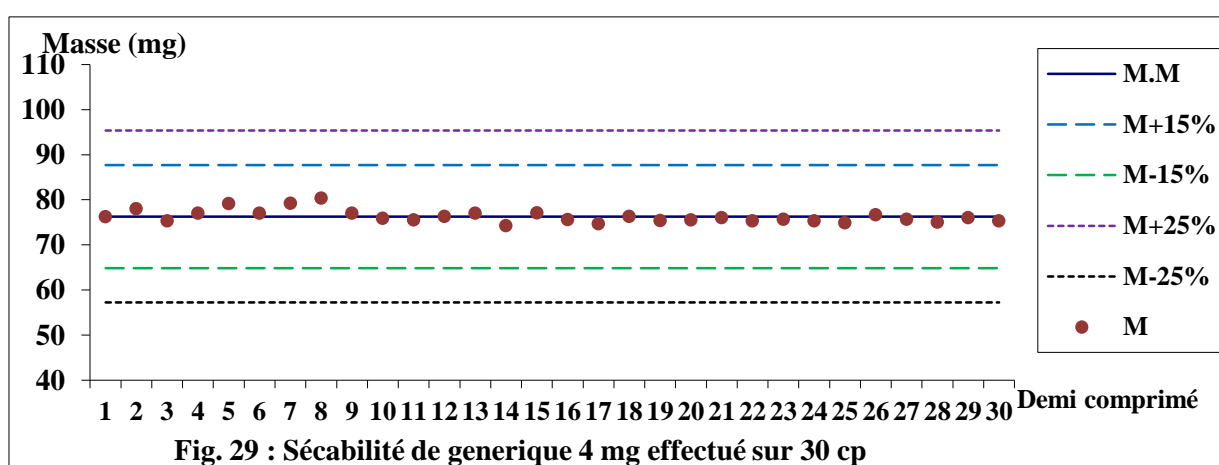
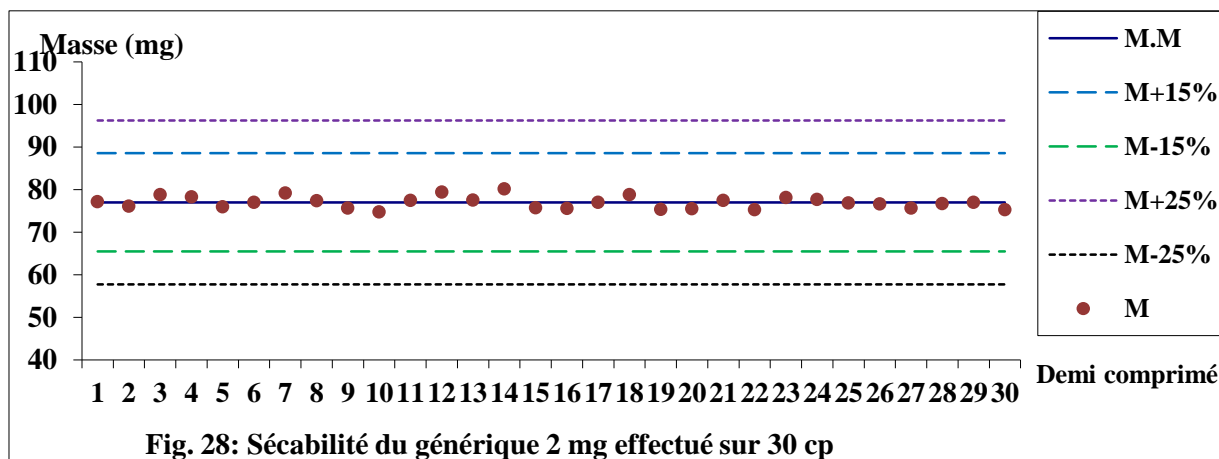
### 1.2.6. Essai de sécabilité

#### - Le test de sécabilité effectué par pesée de 30 demi-comprimés

Les comprimés ne satisfont pas à l'essai si la masse individuelle d'un demi-comprimé sur les 30 unités testées se trouve en dehors des limites de 15 % à 25 % de la masse moyenne.

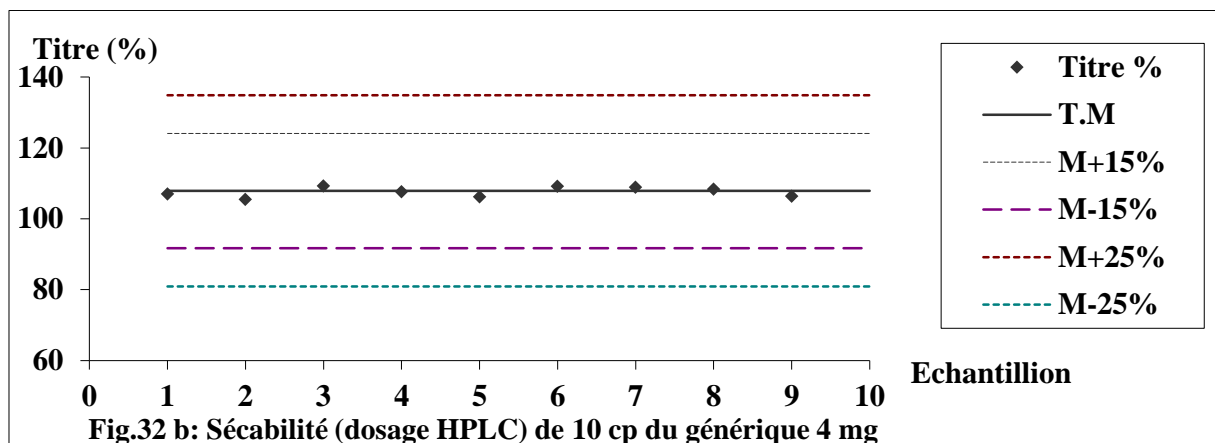
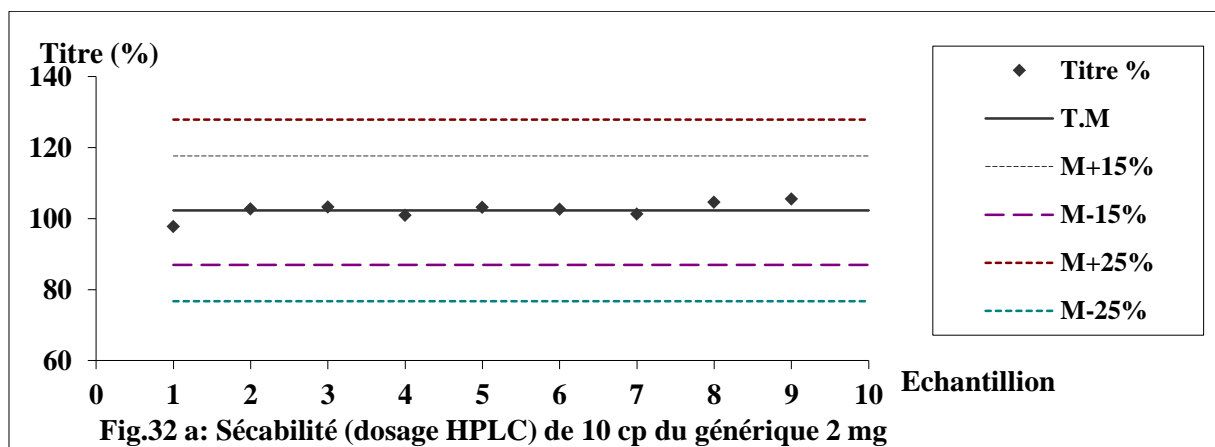
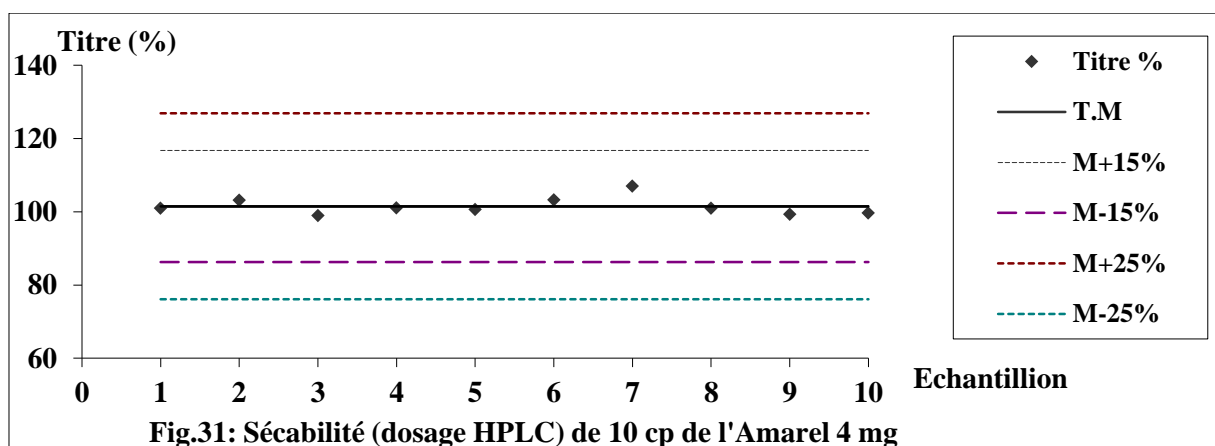
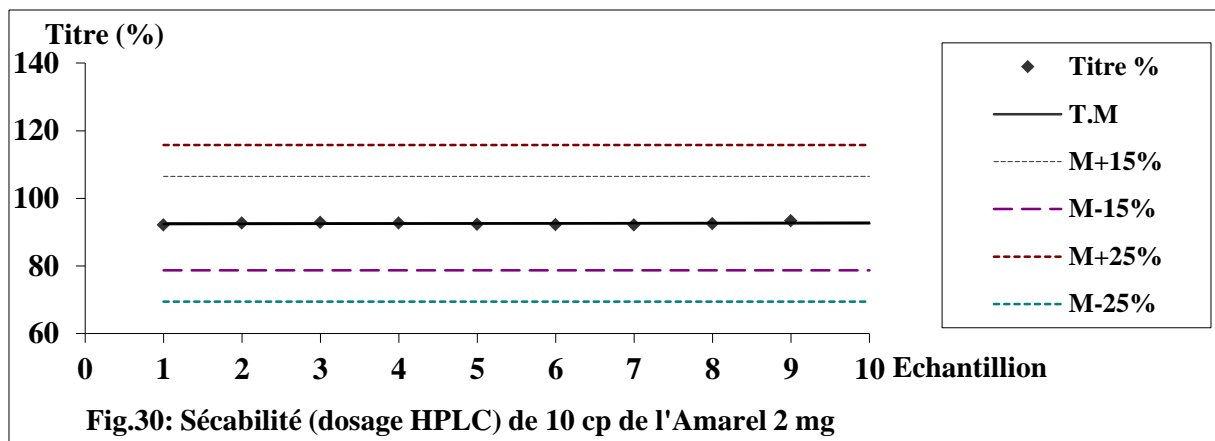


Les résultats obtenus pour le test de sécabilité réalisé par pesée de 30 demi-comprimés (générique 2 et 4 mg ; Amarel 2 et 4 mg) sont proches de leurs masses moyennes, aucune unité ne montre une masse en dehors des limites 15% et 25 % de la masse moyenne des 30 comprimés testés de chaque échantillon (**Fig. 26, 27, 28 et 29**).



### - Dosage HPLC d'uniformité de teneur lors de l'essai de sécabilité

Les résultats obtenus pour le test d'uniformité de teneur par HPLC lors de l'essai de sécabilité de tous les échantillons (générique 2 et 4 mg ; Amarel 2 et 4 mg) sont proches de leurs moyennes de titre ; aucun comprimé ne montre un titre en dehors des limites 15% et 25% de la moyenne des titres des 10 comprimés testés de chaque échantillon (**Fig. 30, 31, 32 a et 32 b**).



T : le titre en glimépiride en %, M : la moyenne

### 1.2.7. Le contrôle de l'étanchéité des blisters

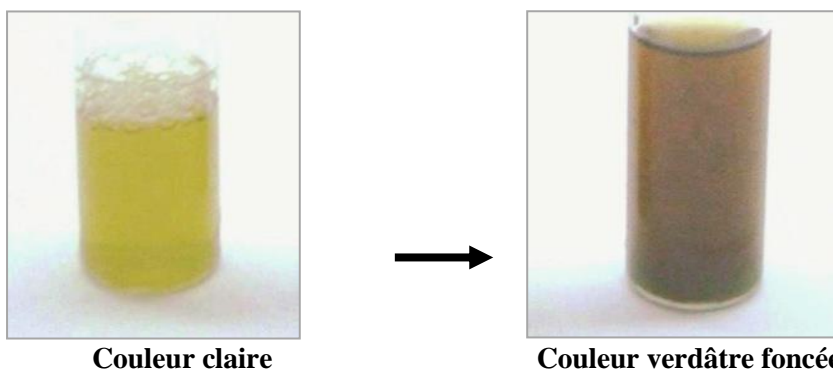
Le contrôle de qualité du conditionnement est effectué après mise en blisters du produit fini, une bonne étanchéité du blistérage permet une longue durée de conservation du médicament (**Giron, 1988**). Tous les échantillons analysés ont montré une étanchéité des blisters, et donc un bon conditionnement lors du stockage et de leur commercialisation.

## 2. Screening phytochimique de la plante

### 2.1. Tests préliminaires sur l'infusé

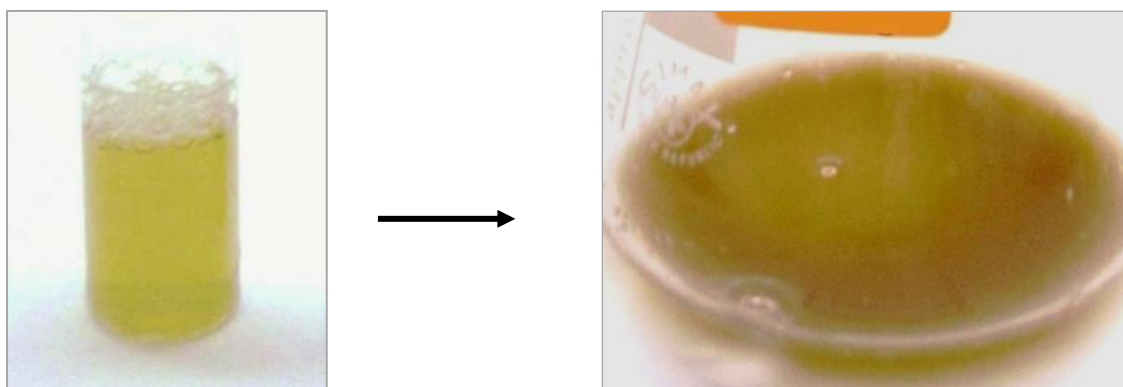
#### 2.1.1. Recherche des Tanins

Après l'ajout de 1 ml de  $\text{FeCl}_3$  à 1% à 05 ml d'infusé, une coloration verdâtre a indiqué la présence des **Tanins catéchiques** dans notre échantillon.



**Fig. 33 :** Recherche des tanins dans la partie aérienne (test positif).

- Après l'ajout de **15 ml** de réactif de **Stiasny** à **30 ml** de l'infusé et le chauffage au bain-marie → l'apparition d'un précipité orange confirme la présence des **Tanins catéchiques** dans notre échantillon.

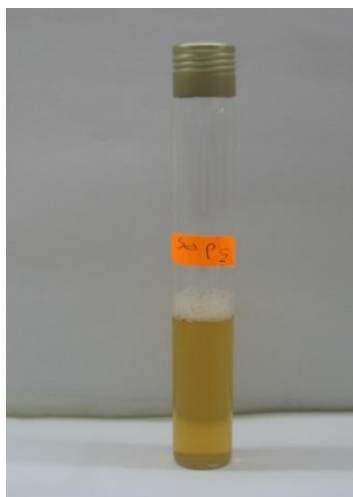


**Fig. 34 :** Recherche des tanins par le réactif de **Stiasny** dans la partie aérienne (test positif).

### 2.1.2. Recherche des Saponosides

Le tube qui a montré une hauteur de 1 cm de mousse persistante est le tube n°02.

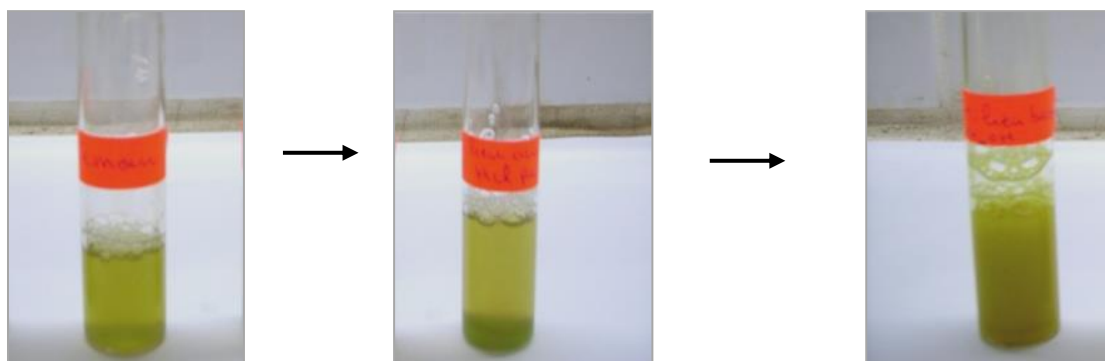
Donc :  $I = 450$ , ce qui explique une teneur importante en **Saponosides** et surtout en **Saponines** ( $I > 100$ ).



**Fig. 35:** Recherche des Saponosides dans la partie aérienne (test positif).

### 2.1.3. Recherche des Anthocyanes

La recherche des Anthocyanes dans la partie aérienne de *Zygophyllum cornutum* Coss a montré un résultat positif après le changement du pH de l'infusé, un changement de couleur a été observé.



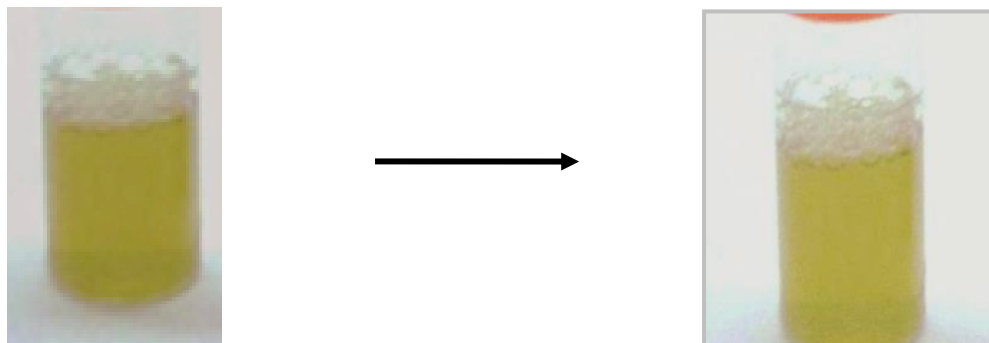
**Changement de couleur après l'ajout du  $NH_4OH$  .**

**Fig. 36:** Recherche des Anthocyanes dans la partie aérienne (test positif).



### 2.1.4. Recherche des Leuco-anthocyanes

Le test de cette recherche a révélé l'absence des Leuco-anthocyanes dans la partie aérienne de la plante.



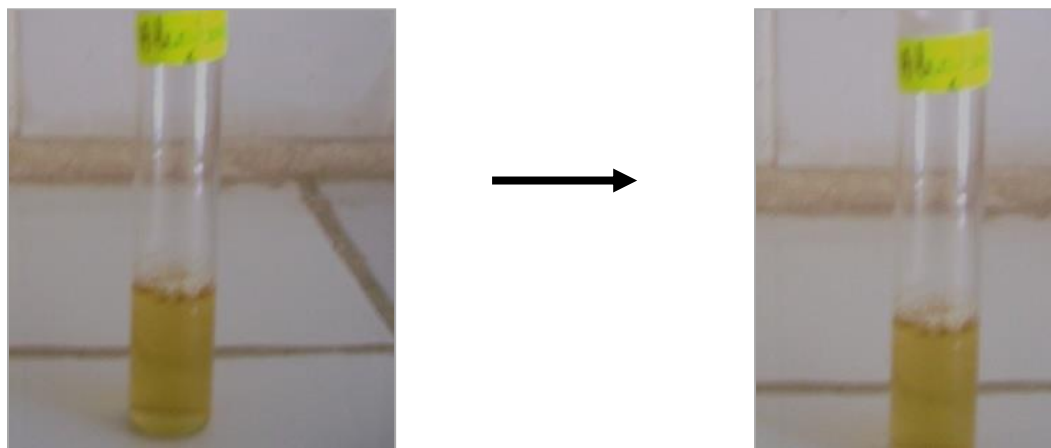
**Pas de changement de couleur après le chauffage au bain-marie.**

**Fig. 37:** Recherche des Leuco-anthocyanes dans la partie aérienne (test négatif).

## 2.2. Tests préliminaires sur la poudre

### 2.2.1. Recherche des Alcaloïdes

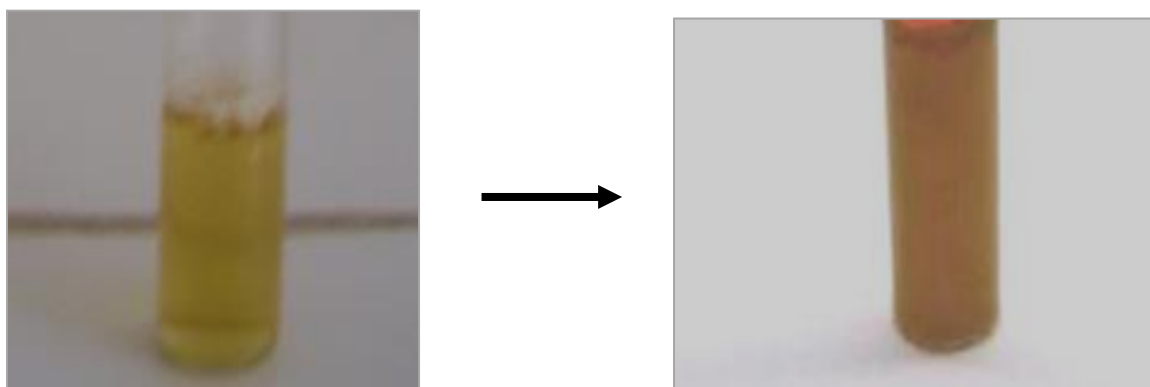
Le résultat de la recherche des Alcaloïdes était négatif, pas de précipité lors de l'ajout du réactif de Mayer.



**Fig. 38 :** Recherche des Alcaloïdes dans la partie aérienne (test négatif).

### 2.2.2. Recherche des Flavonoïdes

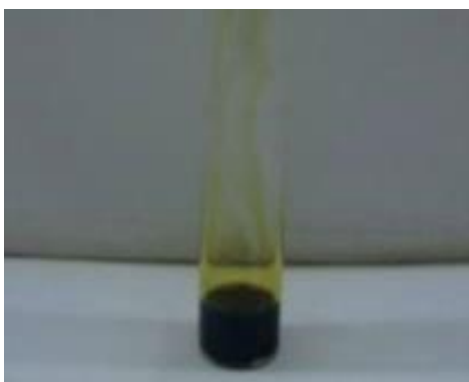
Ce test était également positif, le changement du pH a provoqué l'apparition de la couleur jaune claire dans la partie supérieure.



**Fig. 39:** Recherche des Flavonoïdes dans la partie aérienne (test positif).

### 2.2.3. Recherche des Cardinolides

L'apparition d'une coloration vert bleu indique la présence des Cardinolides dans la partie aérienne de la plante.



**Fig. 40 :** Recherche des Cardinolides dans la partie aérienne (test positif).

### 2.2.4. Résultat de la recherche des Stérols et Terpènes

Le résultat obtenu est positif, formation d'un anneau marron qui devient gris indique la présence des Stérols et Terpènes.



**Fig. 41:** Recherche des Stérols et Terpènes dans la partie aérienne de la plante (test positif).

Si nous récapitulons la composition chimique du *Zygophyllum cornutum* Coss, on constate trois principes actifs : **Tanins Catéchiques** (ayant un pouvoir anti-hyperglycémiant en diminuant la résistance à l'insuline, antioxydant et antimicrobien), **Saponosides** (possède une activité antioxydante et reconstructive) et **Flavonoïdes** (anti-hyperglycémiants, anti-inflammatoires, antioxydants) qui sont dominants dans la partie aérienne de la plante (Ojewole, 2005), une teneur non négligeable en **Stérols et Terpènes**, la présence des **Anthocyanes** et **Cardinolides** mais en faible quantité avec absence des **Alcaloïdes** et **Leuco-anthocyanes** (Tab.VI).

**Tableau VI : Tableau récapitulatif de la composition chimique de  
« *Zygophyllum cornutum* Coss »**

Principe actif	Partie aérienne de la plante
<b>Tanins Catéchiques</b>	(+++)
<b>Saponosides</b>	(+++)
<b>Anthocyanes</b>	(+)
<b>Leuco-Anthocyanes</b>	(-)
<b>Alcaloïdes</b>	(-)
<b>Flavonoïdes</b>	(+++)
<b>Cardinolides</b>	(+)
<b>Stérols et Terpènes</b>	(++)

(-) : absence

(+) : présence en faible quantité.

(++) : présence en quantité moyenne.

(+++): présence en quantité importante.

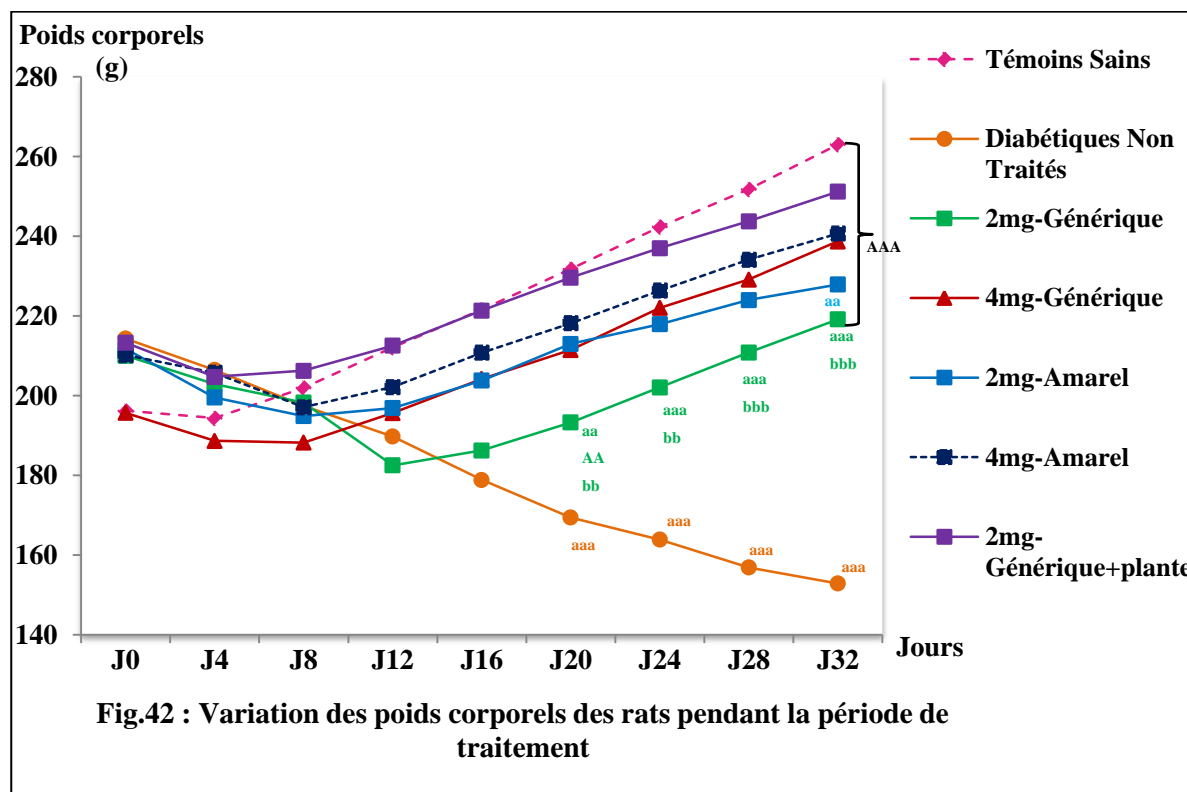
Ces résultats sont comparables avec ceux déjà obtenus d'une étude sur une espèce du même genre : *Zygophyllum geslini* ; on remarque également que ces deux espèces possèdent des principes actifs communs (Flavonoïdes, Saponosides et Tanins) (Ozenda, 1977).

### 3. Résultats de l'étude biologique

#### 3.1. Evolution des poids corporels et des glycémies avant sacrifice

Les figures suivantes présentent les résultats des mesures des poids corporels et des glycémies suivis avant sacrifice, pendant le traitement des animaux.

##### 3.1.1. Poids corporels



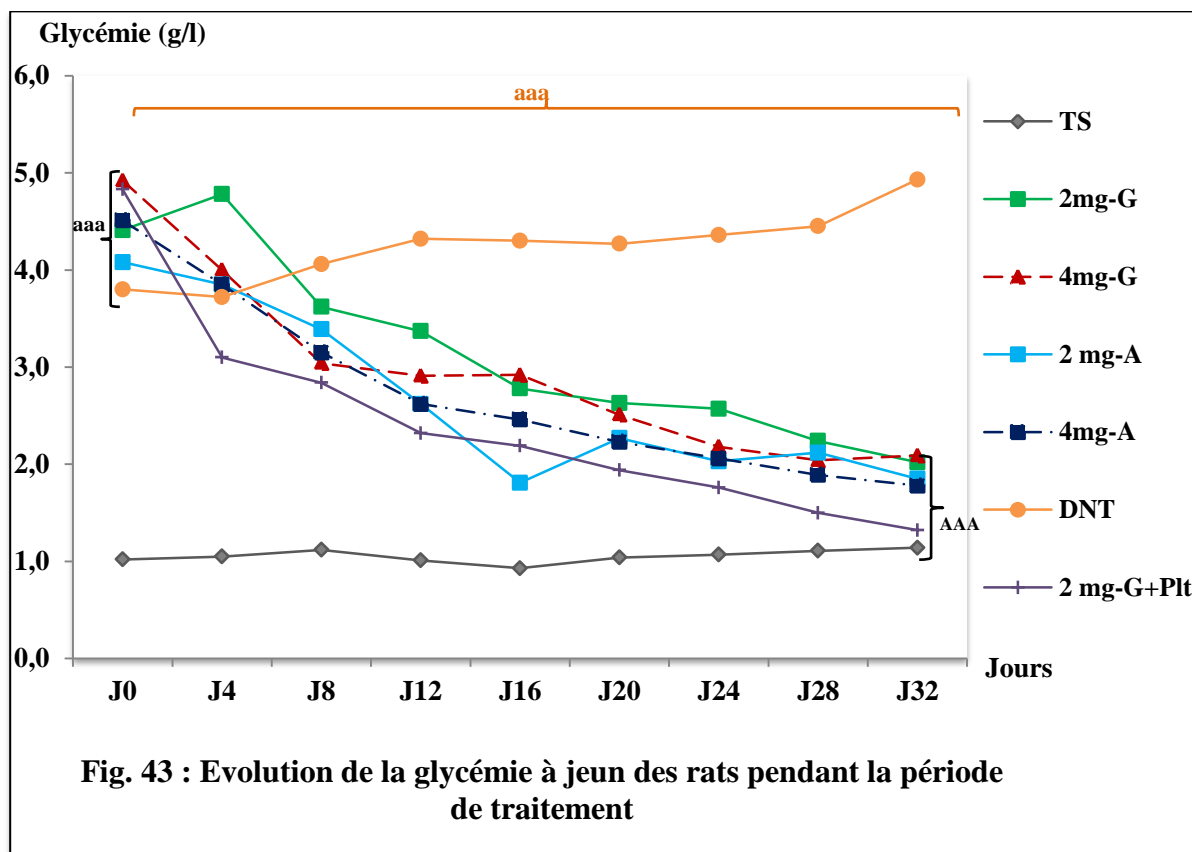
Vs CS : <sup>aa</sup> ( $P \leq 0,01$ ), <sup>aaa</sup> ( $P \leq 0,001$ ) ; Vs CD : <sup>AA</sup> ( $P \leq 0,01$ ), <sup>AAA</sup> ( $P \leq 0,001$ ) ; 2mg-G Vs 4mg-G : <sup>bb</sup> ( $P \leq 0,01$ ), <sup>bbb</sup> ( $P \leq 0,001$ ).

D'après les résultats obtenus (Fig. 42), on remarque une augmentation des poids corporels des rats témoins sains (TS) qui serait liée à la croissance normale des animaux, ainsi qu'une chute des poids des rats du lot diabétique non traité (DNT) qui serait liée aux troubles métaboliques dus au diabète. L'absence d'insuline activerait la lipolyse au niveau du tissu adipeux et entraînerait un amaigrissement (Guillausseau & Laloi-Michelin, 2003), de plus, ces animaux n'ont pas reçu de traitement.

Une augmentation des poids des lots diabétiques traités par les deux doses des deux médicaments a été observée; cependant elle demeure inférieure à celle observée chez les rats témoins sains, TS. Ceci suggérerait que les deux médicaments générique et princeps ont exercé un léger effet sur l'activité insulinaire du pancréas, entraînant une légère lipogenèse,

ce qui a permis cette récupération des poids corporels; ce gain de poids est aussi dû à la croissance normale des rats. Mais des études de l'effet du glimépiride sur les poids corporels chez l'homme diabétique montrent que le traitement par ce médicament n'est pas associé à un gain de poids (Bugos *et al.*, 2000; Weitgasser *et al.*, 2003; Davis, 2004). Alors que le lot traité par le mélange, générique et l'extrait d'une plante (*Zygophyllum cornutum* Coss), a donné un résultat meilleur, proche de celui des témoins sains.

### 3.1.2. Glycémie



Vs TS: <sup>aaa</sup> ( $P \leq 0,001$ ) différence très hautement significative; Vs DNT: <sup>AAA</sup> ( $P \leq 0,001$ ) différence très hautement significative.

Les mesures des glycémies à jeun avant et après traitement sont montrées sur la **Figure 43**; montrent que le lot témoin sain ne présente pas de variation des concentrations de glucose sanguin pendant les 32 jours du traitement. Par contre, on a observé chez le lot diabétique non traité une augmentation très hautement significative de la glycémie (29,74 %) pendant cette période; ce qui serait liée à l'effet toxique de l'alloxane sur les cellules  $\beta$  pancréatiques (Lenzen, 2008) et à la maladie et la non prise en charge des rats (Guillausseau & Laloi-Michelin, 2003).

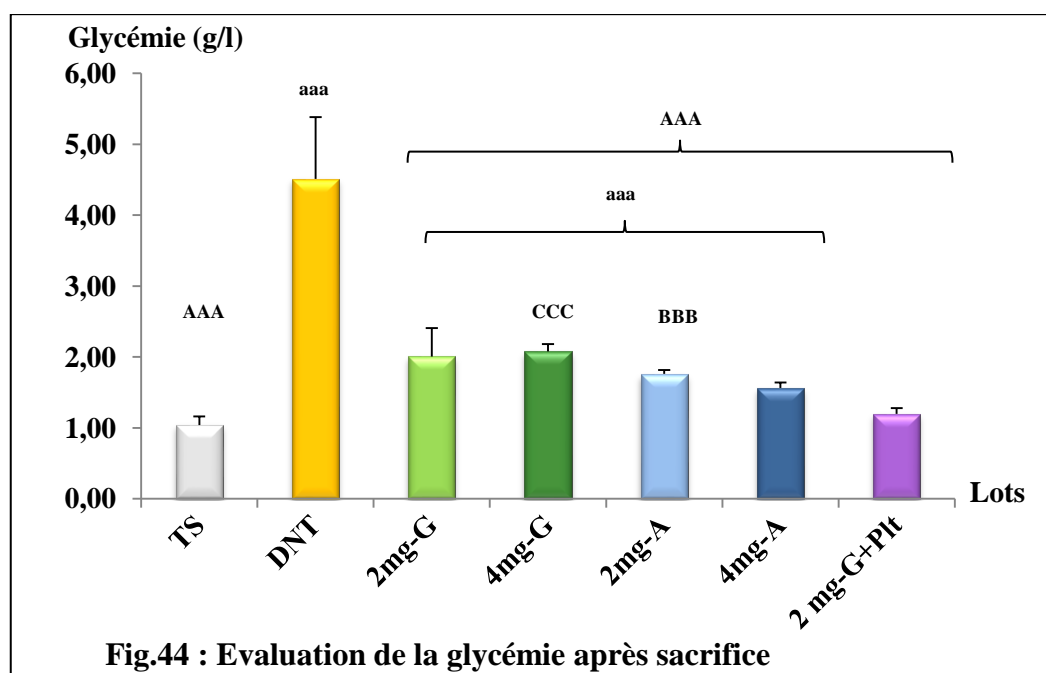
Les lots diabétiques traités par la dose 4 mg/jour du générique et du princeps, présentent une diminution des glycémies de 57,52 % et 60,53 % respectivement; cette baisse est plus importante que celle obtenue par la dose 2 mg/jour (54,20 % pour le générique et 54,66 % pour l'Amarel).

La combinaison du générique à raison de 2 mg/jour avec l'extrait aqueux de *Zygophyllum cornutum* Coss à la dose de 80 mg/kg, a entraîné une baisse significative des glycémies comparée aux traitements par les médicaments seuls et très hautement significative par rapport au lot diabétique non traité, DNT (72,67%).

### 3.2. Paramètres biochimiques après sacrifice

L'évaluation de l'effet du générique glimépiride par rapport à l'Amarel sur quelques paramètres biochimiques après sacrifice (glycémies, profils lipidiques, activités enzymatiques et paramètres rénaux) est présentée sur les figures 44, 45, 46, 47, 48, 49 et 50 et les tableaux VII et VIII.

#### 3.2.1. Glycémie et HbA<sub>1c</sub>



Vs TS: <sup>aaa</sup> ( $P \leq 0,001$ ) ; Vs DNT: <sup>AAA</sup> ( $P \leq 0,001$ ) ; 2mg-A Vs 4mg-A: <sup>BBB</sup> ( $P \leq 0,001$ ); 4mg-G Vs 4mg-A : <sup>CCC</sup> ( $P \leq 0,001$ ).

Les résultats obtenus après 32 jours de traitement (Fig.44) montrent un taux élevé du glucose sanguin chez les contrôles diabétiques par rapport aux témoins sains, ce qui pourrait être la conséquence du diabète (Mahato *et al.*, 2011).

En revanche, le traitement avec le glimépiride a entraîné une diminution de la glycémie chez tous les lots traités (**Davis, 2004,**), cette diminution reste assez élevée par rapport au lot témoin sain. On constate un effet dose-dépendant du princeps; en effet une différence très hautement significative est observée entre les glycémies à jeun chez les rats traités par 2 mg (**1,76 g/l**) comparée à ceux traités par 4 mg (**1,56 g/l**).

Alors que pour les deux doses du générique, on ne note pas de différence entre les glycémies (**2,01 g/l** pour la dose 2 mg et **2,08 g/l** pour la dose 4 mg). Cet effet antidiabétique moindre marqué par le générique, avant et après sacrifice, pourrait être liée à son contenu en principe actif ou à son excipient, différent de celui du princeps, qui conditionnerait la vitesse de libération du principe actif (**Bagheri, 2007**).

Seul le mélange médicament-extrait de plante a donné un rétablissement de la glycémie supérieur à celui des lots traités par les deux médicaments quelque soit la dose; la glycémie observée pour ce lot est proche de celle des TS. Ce résultat a été aussi obtenu avec la glycémie avant sacrifice. Peu de recherche ont été réalisées sur ces associations dont une étude a rapporté l'intérêt de la combinaison du glimépiride aux extraits de plante pour l'amélioration de la glycémie en utilisant une dose médicamenteuse réduite (**Yadav et al., 2010**)

La détermination de l'HbA<sub>1C</sub> chez les diabétiques, permet de contrôler l'équilibre de la glycémie pendant une période donnée (trois mois chez l'homme), d'évaluer l'efficacité des traitements et elle est aussi utilisée pour la prédiction de la dyslipidémie chez l'homme diabétique (**Koenig et al., 1976**).

Les taux d'HbA<sub>1C</sub> observés chez les lots traités sont de l'ordre de **5,62 à 6,28%** ; ils sont en accord avec les baisses des glycémies à jeun avant et après sacrifice des animaux (**Fig. 45**), montrant ainsi l'efficacité de ces traitements (**Weitgasser et al., 2003**). Par contre l'HbA<sub>1C</sub> est très élevée chez le lot non traité **DNT** avec une différence très hautement significative comparé au témoin sain et lots traités; cela est lié à une concentration importante en glucose sanguin chez ce lot (**Guillausseau & Laloi-Michelin, 2003**).

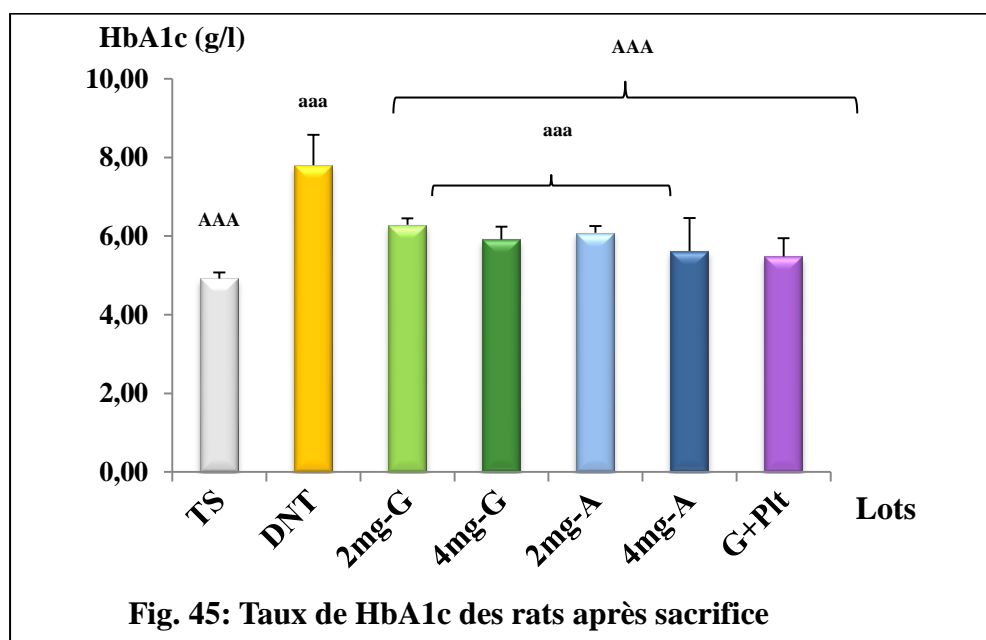


Fig. 45: Taux de HbA1c des rats après sacrifice

Vs TS: <sup>aaa</sup> ( $P \leq 0,001$ ) ; Vs DNT: <sup>AAA</sup> ( $P \leq 0,001$ ) ; 2mg-A Vs 4mg-A: <sup>BBB</sup> ( $P \leq 0,001$ ) ;  
4mg-G Vs 4mg-A : <sup>CCC</sup> ( $P \leq 0,001$ ).

Les animaux traités par toutes les doses du générique ou princeps ne présentent aucune différence significative entre leurs taux d'Hb glyquée mais ces valeurs sont légèrement supérieures à celle des TS.

La supplémentation du générique par l'extrait de la plante semble avoir l'effet le plus efficace sur la glycémie et l'HbA1c. Ce résultat est comparable à ceux trouvés par d'autres auteurs (**Yadav *et al.*, 2010**) ces derniers ont montré que l'association d'une dose faible de certains antidiabétiques avec une dose de plante entraînait un bon contrôle de la glycémie.

### 3.2.2. Profil lipidique

D'après les résultats, on a noté une augmentation très hautement significative de la concentration des TG chez le lot DNT par rapport au lot TS (**Tableau 9**), ce qui serait liée à l'insulinodéficience responsable d'une lipolyse au niveau du tissu adipeux (**Guillausseau & Laloi-Michelin, 2003 ; Mahato *et al.*, 2011**).

Chez tous les lots traités, le taux des TG est réduit, montrant ainsi un effet hypolipémiant du Glimépiride (**Draeger, 1995 ; Xu *et al.*, 2010**). On a également observé une concentration en TG chez le lot traité par le mélange générique-extrait de la plante proche de celle des témoins sains, ce résultat a déjà été obtenu précédemment avec la glycémie et l'HbA1c.



Des taux très élevés en cholestérol total, LDLc et lipides totaux chez les rats DNT ont été constatés, comparés à ceux des témoins sains. Par contre tous les lots traités ont des taux plus faibles que le lot DNT avec une différence hautement significative, ce résultat pourrait être expliqué par l'amélioration du profile lipidique suite au traitement par le glimépiride (**Xu et al., 2010**).

Le dosage des HDLc sériques a révélé un taux plus faible chez le lot DNT comparé au lot TS, avec une différence hautement significative. Cette concentration chez le lot traité par 2 mg de l'Amarel (A-2mg) est similaire à celle des TS.

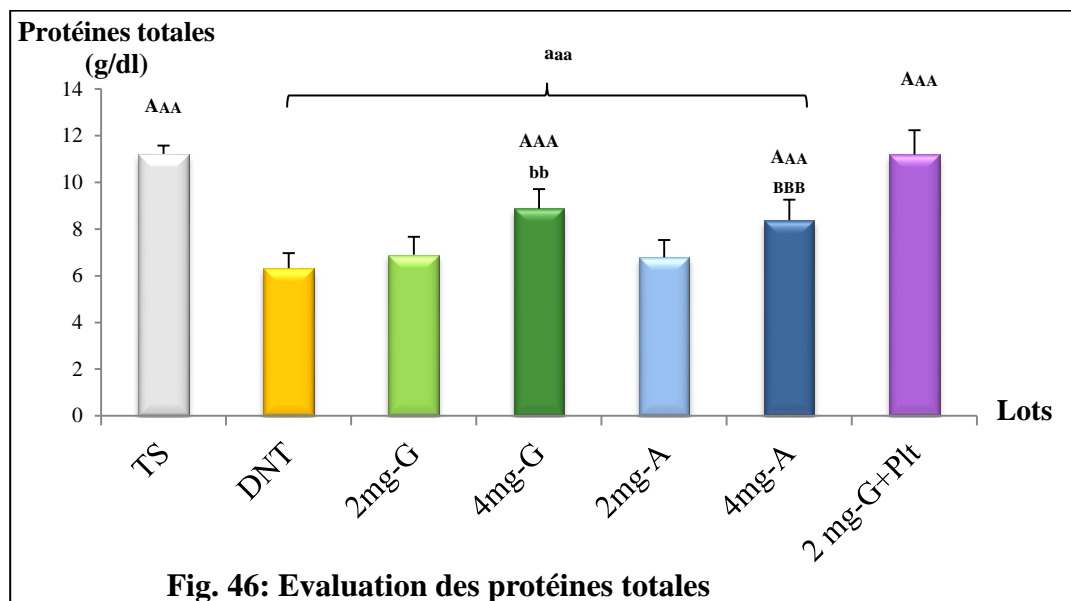
Comparés aux deux lots TS et DNT, les lots A-4mg et 2mg-G+Plt présentent des taux élevés en HDLc, avec une différence très hautement significative. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **T. Araki et al (2003)**, qui ont étudié l'effet du Glimépiride sur l'augmentation des taux d' HDLc.

**Tableau VII: Résultats des dosages des paramètres lipidiques**

Paramètres Groupes	TG (g/l)	LT (g/l)	CT (g/l)	LDLc (g/l)	HDLc (g/l)
<b>TS</b>	1,49 ± 0,14	1,91 ± 0,25	1,22 ± 0,09	0,81 ± 0,16	1,36 ± 0,28
	aaa	aaa	aaa	a	aa
<b>DNT</b>	3,97 ± 0,30	8,43 ± 0,58	2,36 ± 0,37	1,41 ± 0,62	0,90 ± 0,18
	aaa AAA	aaa AAA	aa A	a	A b
<b>2mg-G</b>	2,32 ± 0,27	4,11 ± 0,47	1,68 ± 0,46	1,26 ± 0,47	1,27 ± 0,32
	aa AAA cc	aaa AAA	AAA		A BB
<b>2mg-A</b>	1,86 ± 0,23	4,16 ± 0,63	1,42 ± 0,41	0,92 ± 0,54	1,33 ± 0,35
	aaa AAA b	aaa AAA	aa AAA		AAA CC
<b>4mg-G</b>	1,98 ± 0,21	4,35 ± 0,24	1,46 ± 0,21	0,82 ± 0,31	1,61 ± 0,14
	aa AAA	aaa AAA	AAA	A	aaa AAA
<b>4mg-A</b>	1,76 ± 0,15	4,52 ± 0,79	1,42 ± 0,35	0,73 ± 0,33	1,95 ± 0,14
	AAA	aaa AAA	AAA		aa AA
<b>G+Plt</b>	1,52 ± 0,08	4,47 ± 0,09	1,40 ± 0,20	0,87 ± 0,25	1,83 ± 0,14

Vs TS: <sup>a</sup> (P≤0,05), <sup>aa</sup> (P≤0,01), <sup>aaa</sup> (P≤0,001); Vs DNT: <sup>A</sup> (P≤0,05), <sup>AA</sup> (P≤0,01), <sup>AAA</sup> (P≤0,001);  
 2mg-G Vs 4mg-G: <sup>b</sup> (P≤0,05); 2mg-A Vs 4mg-A: <sup>BB</sup> (P≤0,01); 2mg-G Vs 2mg-A: <sup>cc</sup> (P≤0,01);  
 4mg-G Vs 4mg-A: <sup>CC</sup> (P≤0,01).

### 3.2.3. Protéines totales



**Fig. 46: Evaluation des protéines totales**

Vs TS: <sup>aaa</sup> ( $P \leq 0,001$ ); Vs DNT: <sup>AAA</sup> ( $P \leq 0,001$ ); 2mg-G Vs 4mg-G: <sup>bb</sup> ( $P \leq 0,01$ ); 2mg-A Vs 4mg-A: <sup>BBB</sup> ( $P \leq 0,001$ ).

Les résultats présentés sur la **Figure 46** permettent de constater un taux de protéines sériques totales chez les rats diabétiques non traités plus faible que celui des témoins sains, avec une différence très hautement significative.

Cela pourrait être dû à une perte dans les urines (protéinurie) liée à une hyperglycémie élevée (**Mauer et al., 1981 ; Danish et al., 2013**), à l'action toxique de l'alloxane sur les reins (**Lenzen, 2008; Sachin et al., 2009**) ou à la conséquence de l'augmentation du catabolisme protéique lié à l'absence d'insuline (**Almdal & Vilstrup 1988**). Les protéines totales des lots traités par 4 mg des deux médicaments sont proches entre elles mais restent plus faibles que celles des TS; alors que les protéines du lot traité par le mélange médicament-extrait sont similaires à celles des TS.

### 3.2.4. Activité enzymatique

#### ▪ Les aminotransférases

Une augmentation très hautement significative de l'activité des aminotransférases sériques chez les rats témoins diabétiques a été notée par rapport à celle des témoins sains. Cette forte activité enzymatique des AST et ALT peut être expliquée par l'effet hépatotoxique de l'alloxane (**Lenzen, 2008**).

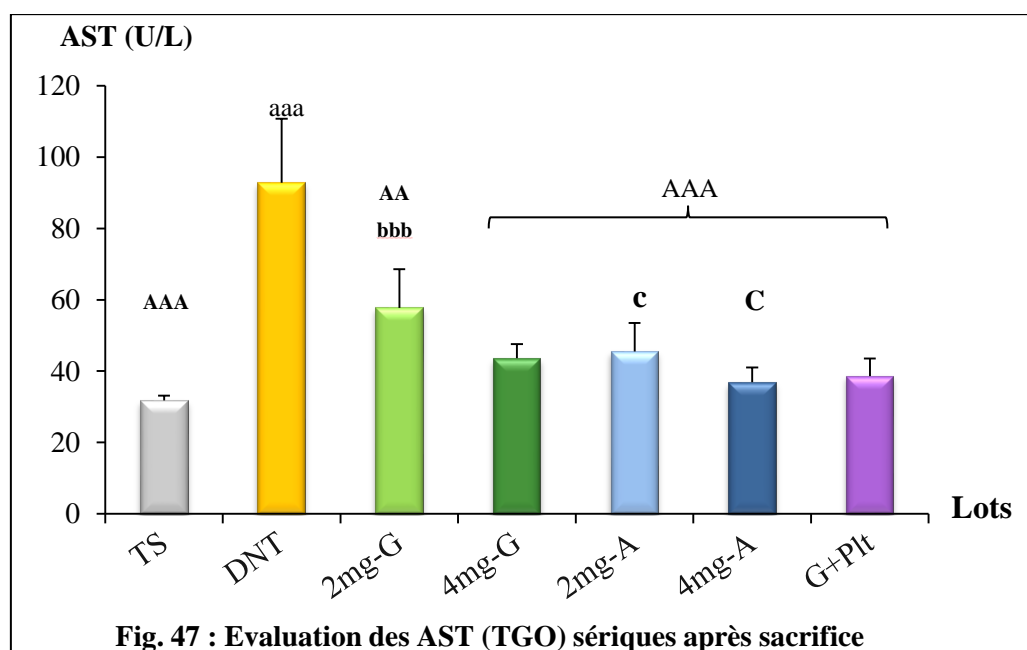


Fig. 47 : Evaluation des AST (TGO) sériques après sacrifice

Vs TS: <sup>aaa</sup> ( $P \leq 0,001$ ); Vs DNT: <sup>AA</sup> ( $P \leq 0,01$ ), <sup>AAA</sup> ( $P \leq 0,001$ ); 2mg-G Vs 4mg-G : <sup>bb</sup> ( $P \leq 0,01$ ), <sup>bbb</sup> ( $P \leq 0,001$ ); 2mg-G Vs 2mg-A: <sup>c</sup> ( $P \leq 0,05$ ); 4mg-A Vs 4mg-A: <sup>c</sup> ( $P \leq 0,05$ ), <sup>CC</sup> ( $P \leq 0,01$ ).

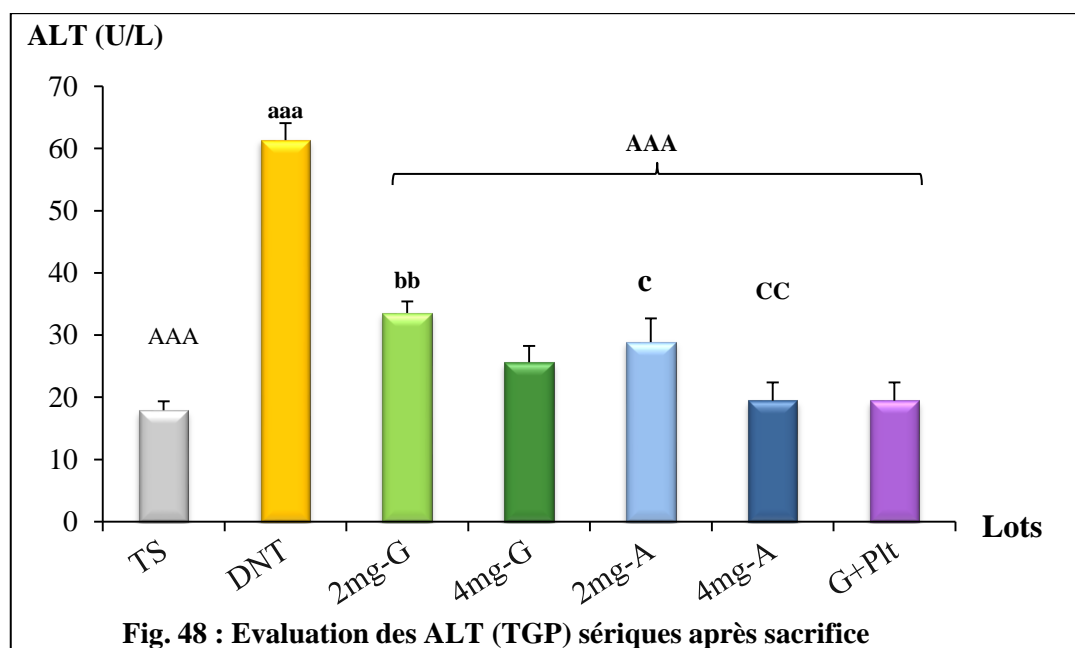


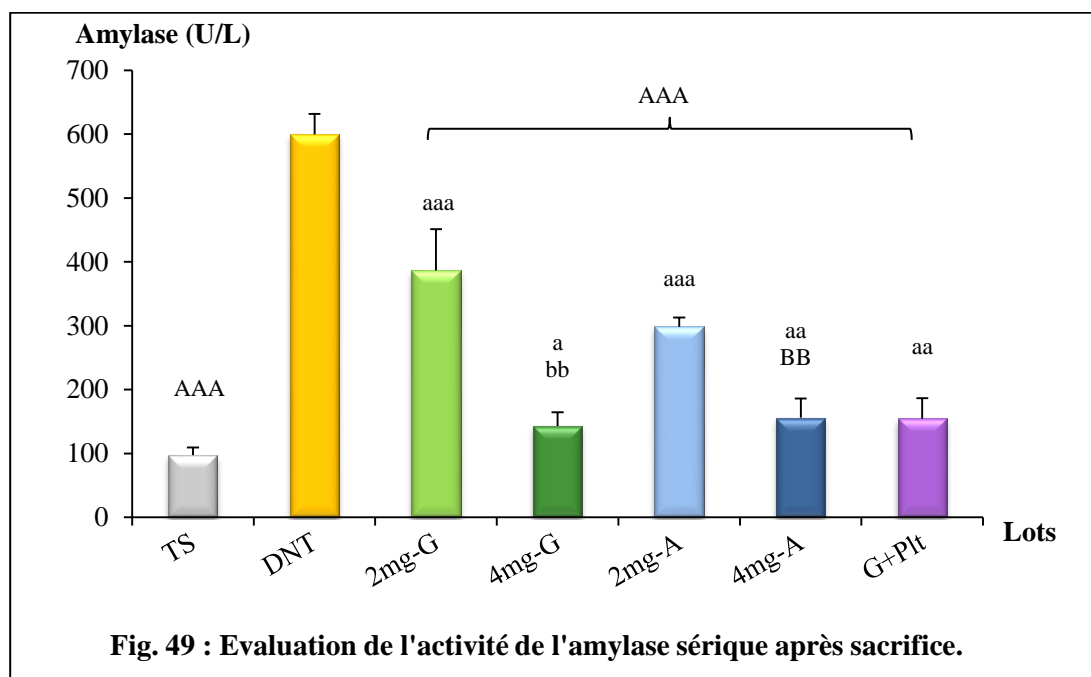
Fig. 48 : Evaluation des ALT (TGP) sériques après sacrifice

Vs TS: <sup>aaa</sup> ( $P \leq 0,001$ ); Vs DNT: <sup>AA</sup> ( $P \leq 0,01$ ), <sup>AAA</sup> ( $P \leq 0,001$ ); 2mg-G Vs 4mg-G : <sup>bb</sup> ( $P \leq 0,01$ ), <sup>bbb</sup> ( $P \leq 0,001$ ); 2mg-G Vs 2mg-A: <sup>c</sup> ( $P \leq 0,05$ ); 4mg-A Vs 4mg-A: <sup>c</sup> ( $P \leq 0,05$ ), <sup>CC</sup> ( $P \leq 0,01$ ).

En revanche, le traitement des rats diabétiques par l'Amarel et son générique a entraîné des activités AST et ALT réduites avec une différence très hautement significative, comparée aux DNT. Ces activités sont plus élevées chez les lots traités par 2 mg des deux médicaments comparés aux lots traités par 4 mg, avec une différence significative (Fig. 47 et 48).

Le traitement a entraîné une atténuation de l'activité de ces deux enzymes et par conséquent, a exercé un effet protecteur vis-à-vis de l'altération hépatique causée par l'alloxane, le meilleur effet a été obtenu avec la dose 4 mg de l'Amarel et le mélange générique-extrait de plante. Une étude a rapporté que Glimépiride l'effet bénéfique sur les aminotransférases (Mwafy & Yassin MM, 2011).

### ▪ Les activités de l' $\alpha$ -amylase et lipase sériques

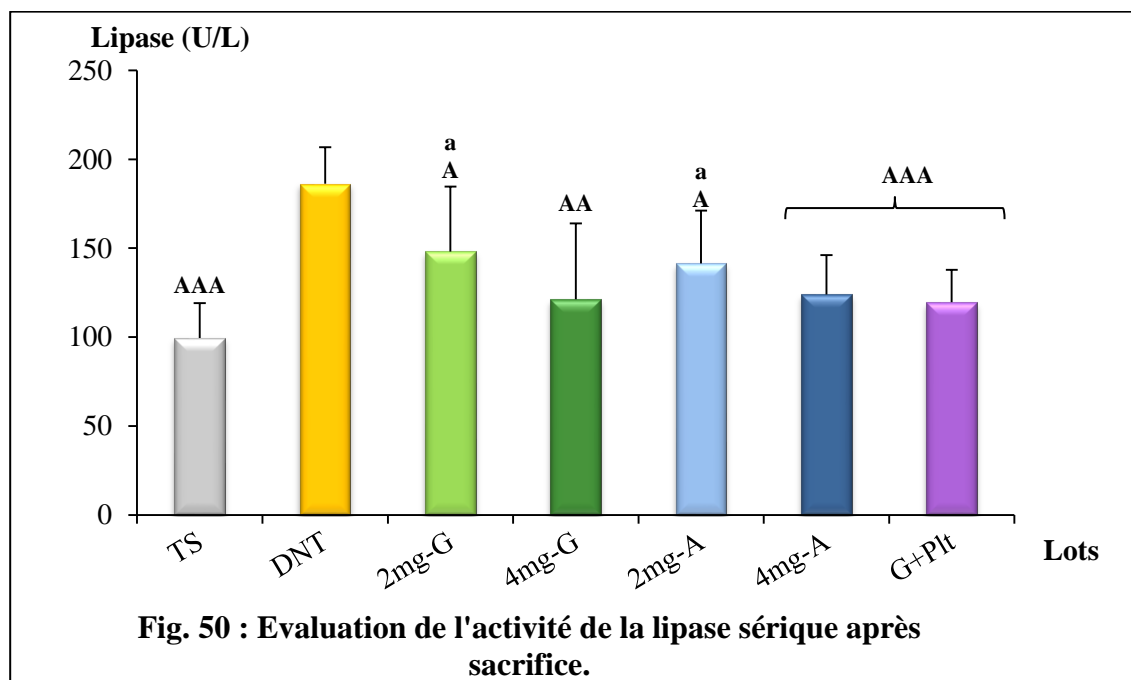


**Fig. 49 : Evaluation de l'activité de l'amylase sérique après sacrifice.**

Vs TS : <sup>a</sup> ( $P \leq 0,05$ ), <sup>aa</sup> ( $P \leq 0,01$ ), <sup>aaa</sup> ( $P \leq 0,01$ ) ; Vs DNT : <sup>A</sup> ( $P \leq 0,05$ ), <sup>AA</sup> ( $P \leq 0,01$ ), <sup>AAA</sup> ( $P \leq 0,001$ ) ; 2mg-G Vs 4mg-G : <sup>bb</sup> ( $P \leq 0,01$ ) ; 2mg-A Vs 4mg-A : <sup>BB</sup> ( $P \leq 0,01$ ).

La détermination des activités de l'amylase et lipase sériques permet le diagnostic des atteintes pancréatiques (Nechales, 1961). Chez les rats diabétiques non traités, on constate de fortes activités de l'amylase et la lipase sériques, par rapport au groupe contrôle sain ( $p \leq 0,001$ ); suggérant ainsi une altération du pancréas provoquée par l'Alloxane (Sachin *et al.*, 2009)

La dose 4 mg des deux médicaments ainsi que la combinaison du générique avec l'extrait de plante ont provoqué des diminutions très hautement significatives de l'activité de l'amylase, comparés au lot diabétique non traité ( $p \leq 0,001$ ). Des activités réduites de l'amylase sérique ont également été observées chez les groupes diabétiques traités par 2 mg du princeps et du générique, par rapport à celles du groupe témoin diabétique mais restent élevées par rapport à celles des témoins sains ( $p \leq 0,001$  Vs TS).



**Fig. 50 : Evaluation de l'activité de la lipase sérique après sacrifice.**  
Vs TS: <sup>a</sup> ( $P \leq 0,05$ ), <sup>aa</sup> ( $P \leq 0,01$ ), <sup>aaa</sup> ( $P \leq 0,01$ ) ; Vs DNT : <sup>A</sup> ( $P \leq 0,05$ ), <sup>AA</sup> ( $P \leq 0,01$ ), <sup>AAA</sup> ( $P \leq 0,001$ ).

L'activité lipasique, chez tous les lots traités est plus faible que celle des DNT ; seuls les lots traités par 4 mg du princeps et du générique ainsi que par le mélange générique- plante ont présenté une différence hautement significative pour le générique et très hautement significative pour l'Amarel et le mélange, comparés au DNT.

### 3.2.5. Paramètres rénaux

Les résultats des mesures des taux sanguins de la créatinine, l'Urée et l'acide urique sont présentés dans le tableau VIII.

L'hyperglycémie chronique et la dyslipidémie sont associées à une variété de troubles métaboliques chez l'homme et l'animal diabétiques (**Mauer et al., 1981**), ce qui provoquerait le stress oxydatif et l'épuisement de l'activité antioxydante du système de défense, il en résulte des taux élevés de ROS (**Almdal & Vilstrup, 1988**).

Les environnements oxydants peuvent causer l'endommagement des cellules et des tissus hépatiques et rénaux (**Mauer et al., 1981 ; Lenzen, 2008**).

Les taux élevés de l'urée et de la créatinine (indices de dysfonctionnement rénal) observés chez les rats témoins diabétiques (**Tableau VIII**) résulterait de l'action des ROS et de l'effet toxique de l'alloxane sur les reins (**Lenzen, 2008**) Le présent traitement s'est avéré efficace en améliorant ces deux paramètres.

Tableau VIII: Evaluation des paramètres rénaux chez les rats.

Paramètres Groupes	Ac. urique (mg/dl)	Urée (g/l)	Créatinine (mmol/l)
	AA	AAA	AAA
TS	2,58 ± 0,44	0,66 ± 0,08	63,64 ± 15,34
			aaa
DNT	3,37 ± 0,42	1,34 ± 0,36	111,68 ± 13,99
	A	AA	NS
2mg-G	2,84 ± 0,21	0,78 ± 0,18	90,88 ± 28,84
	A	AA	AA
2mg-A	2,80 ± 0,37	0,70 ± 0,19	75,03 ± 17,12
	NS	AA	aa
4mg-G	3,05 ± 0,40	0,80 ± 0,13	97,56 ± 14,26
	NS	AAA	A
4mg-A	2,99 ± 0,38	0,74 ± 0,07	87,16 ± 21,23
	A	AAA	AAA
G+Plt	2,71 ± 0,57	0,67 ± 0,08	73,54 ± 14,10

Vs TS: <sup>aa</sup> (P ≤ 0,01), <sup>aaa</sup> (P ≤ 0,001); Vs DNT: <sup>A</sup> (P ≤ 0,05), <sup>AA</sup> (P ≤ 0,01), <sup>AAA</sup> (P ≤ 0,001);  
<sup>NS</sup>: non significative.

Aucune différence significative n'a été enregistrée entre les divers traitements pour les trois paramètres rénaux étudiés.

# *CONCLUSION ET PERSPECTIVES*



### CONCLUSION

Cette étude a consisté à évaluer les caractéristiques physico-chimiques d'un générique du Glimépiride et du princeps l'Amarel, et à comparer leurs effets, selon deux posologies choisies (2 et 4 mg/jour) et une combinaison générique 2 mg avec le décocté d'une plante médicinale locale *Zygophyllum cornutum* Coss, sur des rats avec un diabète induit à l'Alloxane. Les résultats obtenus ont montré que :

L'analyse physicochimique de la matière première du générique ainsi que le contrôle de qualité des deux médicaments Amarel et son générique ont montré une conformité des résultats aux normes des pharmacopées européenne (pour la matière première) et américaine (pour le produit fini).

Le screening phytochimique a révélé La richesse de la plante en tannins, flavonoïdes et saponosides, la présence des stérols et terpènes, des cardinolides et des anthocyanes en faible quantité et l'absence des alcaloïdes et leucoanthocyanes.

Malgré la conformité de ses caractéristiques physicochimiques aux normes américaines, les résultats de l'étude biologique ont révélé que : la récupération des poids corporels est plus importante chez les rats traités par le mélange générique - plante suivi par les lots traités par 4 mg du princeps et du générique respectivement. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour les baisses des glycémies suite aux différents traitements.

Après sacrifice, le traitement combiné des animaux par le glimepiride générique et l'extrait aqueux( décocté), a permis d'obtenir des baisses de glycémie et d'HbA1C supérieurs à ceux traités par le générique ou l'Amarel seuls ; des diminutions assez importantes ont été aussi obtenues avec les doses de 2 et 4 mg de l'Amarel.

Pour les effets sur le profil lipidique, on a obtenu une réduction des taux sériques des triglycérides, cholestérol total, LDLc, lipides totaux chez tous les lots traités, une augmentation des taux des HDLc a été enregistré, le princeps s'est avéré plus efficace que le générique à différentes doses et le mélange a montré encore un effet bénéfique sur ces paramètres.

Les protéines totales ainsi que les activités enzymatiques sériques des transaminases (TGO et TGP), de l'amylase et de la lipase sont améliorées chez les groupes traités par la dose 4 mg des deux médicaments ainsi que le mélange. Les différents traitements ont entraîné des effets similaires sur l'amélioration des taux sériques de l'urée, la créatinine et l'acide urique.

Aucun effet toxique n'a été observé chez les rats traités par les deux médicaments, princeps et générique, aux doses de 2 et 4 mg/ jour, pendant la durée du traitement.

D'après les résultats obtenus, le générique analysé montre une efficacité moindre par rapport au princeps, ce qui nécessite un ajustement des doses pour l'efficacité des traitements.

D'après cette étude, on pourrait suggérer aux fabricants de faire des études sur leurs produits génériques finis afin d'ajuster les doses préconisées pour éviter des sous dosages ou surdosages qui pourraient être dangereux pour les malades.

La réalisation d'une étude de biodisponibilité des produits testés dans cette étude pourrait expliquer la baisse d'effet thérapeutique constaté pour le générique.

La plante combinée au médicament a donné des résultats meilleurs que les autres traitements, l'étude de l'effet antidiabétique des différents extraits de cette plante montrerait le groupement actif possédant ces propriétés.

Il serait également utile de vérifier expérimentalement l'efficacité d'autres médicaments génériques, en particulier ceux destinés aux malades chroniques.

*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Abed F., 2013**, La composition du générique reste méconnue des citoyens. *Algerie news*. Consulté le 11/11/2013 sur : <http://www.algerienews.info/la-composition-du-generique-reste-meconnue-des-citoyens/>

**Abelli C., 1996** ; Générique humanitaires: intérêts et limites des cinétiques de dissolution dans le contrôle qualité des gélules. Application à la tétracycline et à l'indométacine. *Pharm. thesis, Clermont-Fd* : 114. Consulté en : October 2012, sur: <http://www.chmp.org/html/publications.html>.

**Académie nationale de Pharmacie, 2012**, *Médicaments génériques*. Consulté le 18/11/2013 sur : [http://www.acadpharm.org/dos\\_public/RAPPORT\\_GEnEriques\\_VF\\_2012.12.21.pdf](http://www.acadpharm.org/dos_public/RAPPORT_GEnEriques_VF_2012.12.21.pdf)

**Adams CP and Brantner VV, 2006**, « Estimating the cost of new drug development: Is it really \$802 million? », *Health Affairs*, 25, 2: 420-428.

**Almdal TP and Vilstrup H., 1988**, Strict insulin treatment normalizes the organic nitrogen contents and the capacity of urea-N synthesis in experimental diabetes in rats. *Diabetologica*, 31: 114-118.

**Andriollo O., 1997**, «Approvisionnement pour l'aide humanitaire ou les pays en développement: la qualité du médicament multisource», *S.T.P. Pharma Pratiques*, 7, 6: 412-429.

**Anonyme, 2005**, Transposition de la directive 2004/27/CE sur le médicament : la France en retard. *La Revue Prescrire*. Tome 25, 267 : **817-18**

**Anonyme, 2007**, Traitement médicamenteux du diabète de type 2, Recommandation de Bonne Pratique (Recommandation). *Diabetes Metab*, 33, 1-C2 : 1S7 – 1S25. Doi: DM-01-2007-32-1-C2-1262-3636-101019-200701911.

**ANSM (Agence Nationale Française de sécurité du médicament et des produits de santé), 2012**, Les médicaments génériques : des médicaments à part entière. Consulté le 12/02/2013 sur:

[http://ansm.sante.fr/content/download/45165/585839/version/2/file/Ansm\\_Rapport-Generiques\\_Decembre2012-v2.pdf](http://ansm.sante.fr/content/download/45165/585839/version/2/file/Ansm_Rapport-Generiques_Decembre2012-v2.pdf).

- Antognini G., 1987**, "Les génériques", *Journal Suisse de la Pharmacie*, 14: 386.
- Araki T., Emoto M., Konishi T., Ikuno Y., Lee E., Teramura M., Motoyama K., Yokoyama H., Mori K., Koyama H., Shoji T. and Nishizawa Y. 2009**, Glimepiride increases high density lipoprotein cholesterol via increasing adiponectin levels in types 2 diabetes mellitus. *Metab.*, 58: 143-148.
- Arner P, Pollare T, Lithell H and Livingston JN. 1987**; Defective insulin receptor tyrosine kinase in human skeletal muscle in obesity and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 30, 6: 437-440.
- Baba Aissa F. 2000**, Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique d'orient et d'occident. pp: 228, 252, 276.
- Bagheri H., 2007**, Génériques, équivalents thérapeutiques, copies, princeps: similitudes et différences, *Genesis*, 126: 9-11.
- Barham D. and Trinder P., 1972**. An improved color reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst*, 97:142–5.
- Belon JP, Tabutiaux A. et Burdillat F., 2001**, Substitution par les génériques : aide à la pratique officinale, Paris, Elsevier, coll. « *Actu Pharma* », 146.
- Benoît A. and Hervé B., 2003**, Opinion and behaviour of pharmacists towards the substitution of branded drugs by generic drugs survey of 1000 French community pharmacists, *Pharmacy World and Science*, 25, 5: 197-202.
- Blencowe NS, Reichl C., Gahir J. and Paterson I., 2010**; The use of nolvadex in the treatment of generic tamoxifen-associated small joint arthralgia. *Breast*. 19: 243-245.
- Blicklé JF, 2011**, Traitement du diabète en dehors de l'insuline. Endocrinologie-Nutrition. [10-366-R-20]. Doi: 10.1016/S1155-1941(11)48522-X
- Bonner-Weir S., 2000**, Islet growth and development in the adult. *J. Mol. Endocrinol.* 24: 297-302.

- Barham D. and Trinder P., 1972**, An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst*. 97, 151:142-5.
- Briard C. et Braud G., 1995**, "Génériques", *Le Moniteur des Pharmacies et des laboratoires*, 2105 : 16-19.
- Brun J.M., Cathelineau G. and Charbonnel B., 1995**, Recommandations de l'ALFEDIAM. Mise à l'insuline du diabétique non-insulinodépendant (diabétique de type 2). *Diabète et Métabolisme (Paris)*. 21: 291-294.
- Bruneton J., 1999**, Pharmacognosie, Phytochimie et plantes médicinales. Edition Technique et Documentation, 1120 pp.
- Bunsen RW, 1853**, Leibigs, *Ann. Chem.* 86 : 265.
- Bugos C., Austin M., Atherton T. and Viereck C., 2000**, Long-term treatment of type 2 diabetes mellitus with glimepiride is weight neutral: a meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract.* 50: 251–254.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. 2003**;  $\beta$ -cell deficit and increased  $\beta$ -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 52: 102–110.
- Célerier I., 2003**, Faut-il regretter l'accord sur les médicaments génériques ?, *Revue critique de l'actualité scientifique internationale sur le VIH et les virus des hépatites*. 110 Consulté en mai 2013 sur :  
[http://www.pistes.fr/transcriptases/110\\_288.htm](http://www.pistes.fr/transcriptases/110_288.htm)
- Chemtob-Conce MC. 2005**, Brevets pharmaceutiques et santé publique des pays en développement. *Med. & Droit*, 2005, 70 : 23-27.
- Chounta A., Zouridakis S., Ellinas C., Tsiodras S., Zoumpouli C., Kopanakis S. and Giamarellou H., 2005**, Cholestatic liver injury after glimepiride therapy. *J Hepatol.* 42, 6 : 944-6.
- Claudot F and Juillièrre Y. 2007**, Les génériques: aspects juridiques, questions éthiques. *Consensus Cardio pour le praticien*, 33: 26-28.

- Congressional Budget Office, 1998.** How Increased Competition from Generic Drugs has Affected Prices and Returns in the Pharmaceutical Industry ». The Congress of the United States. Congressional Budget Office. CBO Publication. <http://www.cbo.gov>
- Curry DL, Bennett LL, Grodsky GM, 1968;** Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology*; 83: 572–584.
- Danish A., Manju S., Alok M., Pramod WR and Vikas K., 2013,** Improved glycemic control, pancreas protective and hepatoprotective effect by traditional poly-herbal formulation “Qurs Tabasheer” in streptozotocin induced diabetic rats. *Altern. Med.*, 13, 10.
- Davis SN, 2004,** The role of glimepiride in the effective management of Type 2 diabetes. *J. Diabetes Complications*, 18: 367- 376.
- Davit BM, Nwakama PE, Buehler GJ, Conner DP, Haidar SH and Patel DT, 2009.** Comparing generic and innovator drugs: A review of 12 years of bioequivalence data from the United States Food and Drug Administration. *Ann Pharmacother*, 43: 1583-1597.
- De Fronzo RA, 2004;** Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *Int. J. Clin. Pract. Suppl.*; 143: 9–21.
- De Vuono A., Palleria C., De Sarro G. and Gallelli L., 2013a,** Skin rash during the treatment with generic itraconazole: Description of a case. *J Pharmacol Pharmacother*. 52: 321-27.
- De Vuono A., Scicchitano F., Palleria C., Russo E., De Sarro G. and Gallelli L., 2013b.** Lack of efficacy during the switch from brand to generic allopurinol. *J Forensic Leg Med*. 20: 540-42.
- Diez-Perez A., Adachi JD, Agnusdei D, Bilezikian JP, Compston JE and Cummings SR, 2012,** Treatment failure in osteoporosis. *Osteoporos Int*, 23: 2769-2774.

- DPPRG (Diabetes Prevention Program Research Group), 2002**, Reduction in incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformine. *N Engl J Med.* 346: 393-403.
- Draeger E., 1995**, Clinical profile of Glimepiride. *Diabetes Res. Clin. Pract. Suppl.*, 28 : S139-S146.
- Drouin P., Blickle JF, Charbonnel B., Eschwege E., Guillausseau PJ, Plouin PF, Daninos JM, Balarac N. et Sauvanet JP, 1999**, Diagnostic et classification du diabète sucré, les nouveaux critères. *Diab & Metab (Paris)*. 25, 1: 72-83. Doi: DM-05-1999-25-1-1262-3636-101019-ART66
- Duboeuf T., De Widerspach-Thor A., Scotto B. and Bacq Y., 2004**, Acute glimepiride-induced pancreatitis. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 28, 4: 409. Doi : GCB-04-2004-28-4-0399-8320-101019-ART14
- EGIR (The European Group for the study of insulin resistance), 2002**, Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab*; 28: 364-376.
- Eidi A. and Eidi M., 2009**, Antidiabetic effects of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clin Res Rev.* 3: 40–44.
- EMA (European Medicines Agency), 2001**, Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence, CPMP/EWP/QWP/1401/98. Consulté en Mars 2012 sur: <http://www.emea.europa.eu>
- EMA (European Medicines Agency), 2010**, Guideline on the Investigation of Bioequivalence. Consulté le 05/10/2012 sur : <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/qwp/140198enrev1fin.pdf>.
- Fassati P. and Prencipe L., 1982**, Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin hem.* 28: 2077-2080.
- Fassati P., Pricipe L. and Berti G., 1980**, Use of 3,5 -di-chloro 2 ydroxy Benzen sulfonic acid/ 4- aminophenozone chromogenic system indirect enzymatic assay of uric acid in serum and urin. *Clin chem.*, 26: 227-231.



- Faure S., 2011a**, Glitazones. *Actualités pharmaceutiques*. 50, 507: 49-52. DOI: 10.1016/S0515-3700(11)71001-1.
- Faure S., 2011b**, Sulfamides hypoglycémiants. *Actualités pharmaceutiques*. 50, 508: 53-56. DOI: ACTPHA-09-2011-50-508-0515-3700-101019-201104447
- FID (Fédération Internationale de diabète), 2009**. Autosurveillance glycémique dans le diabète de type 2 non traité par l'insuline. 39 p. [www.idf.org](http://www.idf.org) et [www.smbg-iwg.com](http://www.smbg-iwg.com).
- Fischer K., 1939**, Neues Verfahren zur massanalytischen Bestimmung des Wassergehaltes von Flüssigkeiten und festen Körpern; *Angew, Chem*. 48: 394-396.
- FNMF (Fédération Nationale de la Mutualité Française), 2008**, Bilan de 25 ans de politique du médicament générique. Propositions pour une politique plus ambitieuse. *Mutualité Française*. 10 : 64. <http://www.mutualite.fr/La-Mutualite-Francaise>
- Friedewald WT, Levy RI and Fredrickson DS, 1972**, Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.*, 18: 499-502.
- Fujita Y., Honma H., Satoh J., Fujino Y., Onodera M., Inoue Y. and Endo S., 2011**, Detection of glimepiride and rosiglitazone from Chinese dietary supplements. *Chudoku Kenkyu : Chudoku Kenkyukai jun Kikanshi = The Japanese Journal of Toxicology*. 24, 1 : 51-56
- Gallois P., Vallée JP et Le Noc Y., 2009**, Diabète de type 2 et mode de vie. Quels sont les «bons choix» ?; *Médecine*. 5, 8 : 362-8. DOI: 10.1684/med.2009.0463
- Giron D., 1988**, Influence de la qualité des matières premières sur la vitesse de dissolution et la biodisponibilité. *STP Pharma*, 4: 330-340.
- Giron D., 1994**, Thermal analysis and calorimetric methods in the characterisation of Polymorphs and Solvates. *Thermochimica Acta*, 248, 1-59.
- Gonikberg E., 2011**, Glimepiride Tablets. *Pharmacopeial Forum*, 33(3): 411.

- Groop L. 1992**, Sulfonylureas in NIDDM, *Diabetes Care*, 15: 737-754.
- Grove TH, 1979**, Effect of reagent pH on determination of HDL Cholesterol by precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium. *Clin Chem*; 25: 560.
- Gu N., Kim B., Rhim H., Chung J., Kim JR and Shin HS, 2010**, Comparison of the Bioavailability and Tolerability of Fixed-Dose Combination Glimepiride /Metformin 2/500-mg Tablets Versus Separate Tablets: A Single-Dose, Randomized-Sequence, Open-Label, Two-Period Crossover, Study in Healthy Korean Volunteers. *Clinical Therapeutics*. 32, 7.
- Guillausseau PJ and Laloi-Michelin M., 2003**, Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Rev. Med. Interne*, 24: 730-737.
- Gurjar MK, Joshi RA, Chaudhuri SR, Joshi SV, Barde AR, Gediya LK, Ranade PV, Kadam SM and Naik SJ, 2003**, Total synthesis of *cis* and *trans*-hydroxyglimepiride: active metabolite of glimepiride. *Tetrahedron Letters* 44: 4853–4855
- IGAS (Inspection générale des affaires sociales), 2012**. Évaluation de la politique française des médicaments génériques. Mutualité Française, Rapport 2012 sur les génériques, 10 propositions pour restaurer la confiance.
- Jain KK, 1993**, Investigation and management of loss of efficacy of an antiepileptic medication using carbamazepine as an example. *J R Soc Med*, 86: 133-136.
- James RW, 2008**, Quelles approches thérapeutiques de l’hypo-HDL-cholestérolémie? *Rev Med Suisse*. 4: 632-635.
- John R. Fleder, Esq, 1994**, the history, provisions and implementation of the generic drug enforcement act of 1992, *Food and Drug Law Journal*, 49: 89-107.
- Kabadi UM and Kabadi M., 2006**, Comparative efficacy of glimepiride and/or metformin with insulin in type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 72: 265–270.
- Kanis JA, Reginster JY, Kaufman JM, Ringe JD, Adachi JD and Hilgsmann M., 2012**. A reappraisal of generic bisphosphonates in osteoporosis. *Osteoporos Int*, 23: 213-221.

- Kaplan A., 1984**, Urea. *Clin Chem*: 437.
- Karaca M. et Magnan C., 2013**, Production et sécrétion de l'insuline par la cellule  $\beta$  pancréatique. *Endocrinologie-Nutrition*, [58044]. Doi: 10.1016/S1155-1941(13)58044-9
- Karumi Y., Onyeyili PA and Ogugbuaja VO, 2004**, Identification of active principles of *M.balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci.*; 4, 3:179-182.
- Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR, 2002**. Metformin: an update. *Ann Intern Med* 137:25–33.
- Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C., Lehrman M. and Cerami A., 1976**, Correlation of Glucose Regulation and Hemoglobin A<sub>1c</sub> in Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*. 295:417-420. DOI: 10.1056/NEJM197608192950804
- Koller A., 1984**, Total serum protein. *Clin Chem*: 418.
- Korytkowski MT, 2004**, Sulfonylurea treatment of type 2 diabetes mellitus: focus on glimepiride. *Pharmacotherapy*. 24, 5: 606-620.
- L'Association Médicale Mondiale, 2005**, Déclaration de l'AMM sur la Substitution des Médicaments Génériques. Adoptée par la 41e Assemblée Médicale Mondiale Hong Kong, Septembre 1989 et supprimée à l'Assemblée générale de l'AMM, Santiago 2005. <http://www.wma.net/fr/10home/>
- Langtry HD and Balfour JA, 1998**, Glimepiride. *Drugs*. 55, 4 : 563-584. Doi : 10.2165/00003495-199855040-00007
- Le Corre P., 2010**, Narrow therapeutic index drugs: bioequivalence and generics, *La Presse Médicale*, 39, 2: 169-176.
- Lenzen S., 2008**, The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51: 216-226.
- Look Ahead Research Group, 2013**, cardiovascular effects of intensive lifestyle Intervention in type 2 diabetes, *N Engl J Med*. 369, 2: 145 -54.

- Mahato RV, Gyawali P., Raut P., Regmi P., Singh K., Pandeya DR and Gyawali P., 2011**, Association between glycaemic control and serum lipid profile in type 2 diabetic patients: Glycated haemoglobin as a dual biomarker. *Biomed. Res.*, 22, 3: 375-380.
- Masson, A. ; 2005**, « Du rôle directeur des Etats-Unis sur le marché du médicament », *Annales des Mines, Réalités industrielles*, n° février : 40-43.
- Matteucci E. and Giampietro O., 2008**, Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research. *J Ethnopharmacol.* 115: 163–72.
- Mauer SM, Steffes MW and Brown DM, 1981**, The kidney in diabetes. *Am. J. Med.*, 70: 603.
- Mbanya JC., 2010 ;** Global Diabetes Plan, 2011-2021. *International Diabetes Federation*. Consulté en : Avril 2012 sur : <http://www.idf.org/global-diabetes-plan-2011-2021>
- McCrone WC, 1965**, Polymorphism. In *Physics and Chemistry in the organic solid states*. Eds D. FOX and M. M. Labes. Intersciences Publishers, New York, p 725-767.
- Ministère de la Sante, de la Population et de la Réforme Hospitalière, 2008**, Arrêté du 2 Dhou El Hidja 1429 correspondant au 30 Novembre 2008 relatif à l'interdiction d'importation des produits pharmaceutiques et dispositifs médicaux destinés à la médecine humaine fabriqués en Algérie. *Journal Officiel de la République Algérienne*. 70: 11. <http://www.ands.dz/pharmacie-med/JO-70.pdf>
- Mocanu MM, Maddock HL, Baxter GF, Lawrence CL, Standen NB and Yellon DM, 2001**, Glimepiride, a novel sulfonylurea, does not abolish myocardial protection afforded by either ischemic preconditioning or diazoxide. *Circulation*. 103, 25: 3111-6.
- Moffat AC, Osselton MD and Widdop B., 2004**, Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 3rd Edition, *Pharmaceutical Press* : 1205: 1237-1238.

- Mossinghoff GJ, 1999**, « Overview of the Hatch-Waxman Act and Its Impact on the Drug Development Process », *Food and Drug Law Journal*, 54, 2: 187-194.
- Muller G., 2014**. The mode of action of the antidiabetic drug glimepiride-beyond insulin secretion. *Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine & Metabolic Agents*.5, 6 : 499-518. DOI: 10.2174/156801305774962123
- Murray RL, 1984**, Transaminases. *Clin Chem*: 116.
- Mwafy SN and Yassin MM, 2011**, Antidiabetic activity evaluation of glimepiride and Nerium oleander extract on insulin, glucose levels and some liver enzymes activities in experimental diabetic rat model. *Pak J Biol Sci*. 14, 21: 984-90.
- Napoli R., Hirshman MF and Horton ES, 1995**; Mechanisms and Time Course of Impaired Skeletal Muscle Glucose Transport Activity in Streptozocin Diabetic Rats. *J. Clin. Invest.* 96: 427-437.
- National Research Council. 2010**, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, *8th edition*. pp: 1-248. ISBN: 0-309-15401-4.
- Necheles H., 1961**, Amylase and lipase determinations in the diagnosis of pancreatic disease. *J Natl Med Assoc.* 53, 3 : 225-228.
- Neumann U., 1984**, Methods of enzymatic analysis, 3rd edition. 4: 26-34
- Neyrolles N., Blicke JF et Brogard JM, 1998**, Nouvelles thérapies dans le diabète de type 2. *Annal Endocrinol (Paris)*. 59, 2 : 67-77. Doi : AN-09-1998-59-2-0003-4266-101019-ART67
- N'Guessan K., Soro D., Kouassi KE, Amoikon KE, Djaman AJ and Traore D., 2008**, Effet de l'extrait des racines de *Jatropha gossypifolia* sur la glycémie chez le lapin diabétique. *J. Sci. Pharm. Biol.* 9, 1: 13-21.
- Nguyen C., Pan J. and Charles MA, 1998**, Preclinical studies of glimepiride. *Drugs Today (Barc)*. 34, 5:391-400.
- OMC (Organisation Mondiale du Commerce), 2001**, Conférence ministérielle. Quatrième session : Déclaration ministérielle. WT/MIN(01)/DEC/1. (01-5859).  
[http://www.wto.org/french/thewto\\_f/minist\\_f/min01\\_f/mindecl\\_f.htm](http://www.wto.org/french/thewto_f/minist_f/min01_f/mindecl_f.htm)

- OMS, 1996**, Série de Rapport Technique. L'Assurance de la Qualité en Pharmacie. Genève : 121-162.
- OMS, 2003**, Guide sur l'accès aux traitements liés au VIH/SIDA - Recueil d'informations, d'outils et de références à l'intention des ONG, des organisations communautaires (OC) et des groupes de PVS. (143p)  
<http://apps.who.int/medicinedocs/fr/d/Js4891f/7.2.5.html>
- OMS, 2008**, Autorisation de mise sur le marché des médicaments à usage humain notamment d'origine multisource (génériques): manuel à l'usage des autorités de réglementation pharmaceutique. Série Réglementation Pharmaceutique; 13. ISBN 978 92 4 259702 8.
- Ojewole JAO, 2005**. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. *J. Ethnopharmacol.* 99: 13–19.
- Orhan N., Aslana M, Demirci B. and Ergun F., 2012**, A bioactivity guided study on the antidiabetic activity of *Juniperus oxycedrus subsp. oxycedrus* L. leaves. *J Ethnopharmacol.* 140: 409-415.
- Ouali M., 2008**, L'Algérie encourage l'utilisation des médicaments génériques. *Maghreb* (revue de presse). Consulté le 23/02/2011 sur : <http://magharebia.com/fr/articles/awi/features/2008/03/14/feature-01>
- Overkamp D., Volk A, Heide PE, Wahl HG and Rett K., 2002**, Acute effect of glimepiride on insulin-stimulated glucose metabolism in glucose-tolerant insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 25, Nov 11: 2065-2073.
- Owens DR, Luzio SD and Ismail I., 2000**, Increased prandial insulin secretion after administration of a single preprandial oral dose of repaglinide in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 23 : 518-523
- Ozenda P., 1977, Flore du Sahara.** 2<sup>ème</sup> édition (Ed du Centre National de la Recherche scientifique). Paris. ISBN : 2222002923 / 2-222-00292-3

- Pan M., Wei X., Hongchen L., Junli M, Bin G. and Xia W., 2011**, Extrapancratic roles of glimepiride on osteoblasts from rat mandibular bone in vitro: Regulation of cytodifferentiation through PI3-kinases/Akt signalling pathway. *Archives of oral biology*. 56: 307-316.
- Pan XR, Li GW and Hu YH, 1997**, Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and diabetes study. *Diabetes Care*. 20: 537- 544.
- Ph. Eu. (Pharmacopée Européenne), 2011**, Le glimépiride, Ed 6.8.
- Pégorier JP et Girard J., 2004**, Thiazolidinediones et insulino-sensibilité : rôle du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . *Annal Endocrinol*. 65, 1 : 65-72. Doi: AE-02-2004-65-1-0003-4266-101019-ART12
- Perez CMM et Paris R., 1958**, Sur une nouvelle plante hypoglycémiante, le *Zygophyllum cornutum* Cosson. Ed. Paris : la Cour d'Appel.
- Pernet A., 2001**, Les glinides pour contrôler l'excursion glycémique postprandiale. *Revue Médicale Suisse*. 650, 21446. Consulté le 22/05/2011 sur: <http://revue.medhyg.ch/article.php3?sid=21446>
- Prabhakar PK and Doble M., 2008**, A target based therapeutic approach towards diabetes mellitus using medicinal plants. *Curr. Diabetes Rev.*, 4: 291-308.
- Privitera MD, 2008**, Generic antiepileptic drugs: Current controversies and future directions. *Epilepsy Curr*, 8: 113-117.
- Profozic V. et Metelko Z., 1998**, Propriétés pharmacologiques du glimépiride. *Disease Management and Health Outcomes*. 4, Suppl 1 : 29-41.
- Purrello F., Rabuazzo AM, 2000**, Metabolic factors that affect b-cell function and survival. *Diab Nutr Metab*. 13: 84-91.
- Ramenskaya GV, and Shokhin IE, 2009**, Modern approaches to quality evaluation of generic drugs for their registration (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal* 43, 9 : 512-515

- Rammal H., Bouayed J., Desor F., Younos C. and Soulimani R., 2009**, Validation et contribution à l'étude de l'effet antihyperglycémique d'une plante médicinale, le *Momordica charantia* L. *Phytothérapie*. 7: 191–196.
- Reuser A. and Wisselaar H., 1994**, An evaluation of the potential side-effects of alphaglucohydrolase inhibitors used for the management of diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest*. 24, suppl 3: 19-24.
- Rifai N., Bachorik PS and Albers JJ, 1999**, Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Textbook of clinical chemistry. 3rd ed. *Philadelphia: W.B. Saunders Comp*: 809–861.
- Rigalleau V., Lang J. et Gin H. 2007**, Étiologie et physiopathologie du diabète de type 2. *Endocrinologie-Nutrition*. [10-366-D-10]. Doi: 10.1016/S1155-1941(07)46586-6
- Ringe JD and Möller G., 2009**, Differences in persistence, safety and efficacy of generic and original branded once weekly bisphosphonates in patients with postmenopausal osteoporosis: 1-year results of a retrospective patient chart review analysis. *Rheumatol Int*, 30: 213-221.
- Rosenstock J., Samols E. and Muchmore D., 1996**, Glimepiride, a new once daily sulfonylurea. A double blind placebo controlled study of NIDDM patients. *Diabetes Care*.19: 1194-1199.
- Sachin L, Badole SL and Bodhankar SL., 2009**, Concomitant administration of petroleum ether extract of the stem bark of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre with synthetic oral hypoglycaemic drugs in alloxan-induced diabetic mice..*Eur. J. Integr. Med.*, 1: 73-79.
- Scarpello J-HB and Howlett H-CS, 2008**, Metformin therapy and clinical uses. *Diabetes and Vascular Disease Research*. 5, 3: 157-167. DOI: 10.3132/dvdr.2008.027
- Schollmeier U, Brunk R, Mayer D. 1993**. Subchronic and chronic toxicity of the new sulfonylurea glimepiride in dogs. *Arzneimittelforschung*. 43, 10: 1068-1071.



- Scicchitano F., Giofrè C., Palleria C., Mazzitello C., Ciriaco M. and Gallelli L., 2012**, Pharmacovigilance and drug safety 2011 in Calabria (Italy): Adverse events analysis. *J Res Med Sci*, 17: 872- 875.
- Spiller HA, 1998**, Management of Antidiabetic Medications in Overdose. *Drug Safety*. 19, 5 :411-424.
- Stumvoll M, Goldstein BJ and Van Haeften TW. 2005**, Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The lancet*, 365, 9467: 1333–1346. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)61032-X.
- Tange M., Yoshida M., Nakai Y. and Uchida T., 2012**, Comparison between original and generic versions of ceftriaxone sodium preparation for injection: Compatibility with calcium-containing product. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 60: 429-434.
- Tietz NW, 1990**, Clinical Guide to Laboratory Tests, Second Edition W.B. Saunders Company, *Philadelphia*: 554-556.
- Tisseyre M., 1983**, "introduction et définition des médicaments génériques", *labo Pharma problèmes techniques*, 31, 329 : 145-146.
- Tuomilhto J., Lindström J., Eriksson JG, Timo T., Hämäläinen H., Ilanne-Parikka P. et al, 2001**, Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J*. 344: 1343-1350.
- USP, 2012**, Glimepiride Tablets: Performance Tests/Dissolution/Test 1. USP 35–NF30: 3335.
- Veeresham C., Sujatha S. and Rani TS, 2012**, Effect of piperine on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glimepiride in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Nat Prod Commun*. 7, 10:1283-1286.
- Vergès B, 1998**, Traitement des hyperlipoprotéinémies au cours du diabète. *Sang Thrombose Vaisseaux*. 10, 3, 151-157.
- Versantvoort C., Maliepaard M. and Lekkerkerker F., 2008**, Generics: What is the role of registration authorities. *Neth J Med*; 66: 62-66.

- VIDAL, 2010,** Glimépiride. Consulté le 11/11/2010 sur:  
<http://www.vidal.fr/substances/17244/glimepiride/>
- Weir GC, Bonner-Weir S., 2004,** Five stage of evolving  $\beta$ -cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*. 53, *Suppl.* 3: S 16–S 21.
- Virally M., Blickle JF , Girard J., Halimi S., Simone D. and Guillausseau PJ, 2007,** Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes & Metabolism*. 33, 4 : 231-244.
- Weitgasser R., Lechleitner M., Luger A. and Klingler A., 2003.** Effects of glimepiride on HbA1c and body weight in Type 2 diabetes: results of a 1.5-year follow-up study. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 61: 13-19.
- Welschen LMC, Bloemendal E. and Nijpels G., 2005,** Self-monitoring of blood glucose in patients with type 2 diabetes who are not using insulin. *Diabetes Care*. 28: 1510-1517.
- Xu D., Zhao SP, Huang Q., Du W., Liu Y., Liu L. and Xie X., 2010,** Effects of Glimepiride on metabolic parameters and cardiovascular risk factors in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res.Clin. Pract.* , 88: 71-75.
- Yadav M., Lavania A., Tomar R., Prasad GBKS, JainS. and Yadav H., 2010,** Complementary and comparative study on hypoglycemic and antihyperglycemic activity of various extracts of *Eugenia jambolana* seed, *Momordica charantia* fruits, *Gymnema sylvestre*, and *Trigonella Foenum graecum* seeds in rats. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160: 2388-2400.
- Zhu S, St-Onge MP, Heshka S, Heymsfield SB, 2004,** Lifestyle behaviors associated with lower risk of having the metabolic syndrome. *Metabolism*. 53, 11: 1503-1511.

*ANNEXE 01*

*DOSAGES*

*BIOCHIMIQUES*

### DOSAGE DES PARAMETRES BIOCHIMIQUES

Le dosage des paramètres biochimiques a été effectué selon les fiches techniques des Kits Spinreact.

#### 1. Dosage de la glycémie

- **Principe**

Le glucose est oxydé sous l'action de la glucose-oxydase (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ce dernier, en présence de peroxyde (POD) oxyde le phénol et le 4-aminophénasone (chromogène incolore) pour former le quinonéimine, un composé coloré en rouge violet (**Barham & Trinder, 1972**) selon les réactions suivantes :



L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du glucose dans l'échantillon.

- **Mode opératoire**

	Blanc	Etalon	Echantillon
RT (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µl)	-	10	-
Echantillon (µl)	-	-	10

On mélange (à l'aide d'un agitateur), on incube pendant 10 min à 37° C, ou 15 à 20 min à une température ambiante. Les absorbances des échantillons et de l'étalon sont lues contre le blanc à 505 nm, la coloration est stable au moins 30 minutes.

- **Calcul de la concentration :** La concentration du glucose est calculée par la formule suivante :

$$[\text{Glucose}] \text{ (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times 100 \text{ (concentration de l'étalon).}$$

## 2. Lipides totaux

- **Principe**

Les lipides totaux forment avec le phosphovainille et en présence de l'acide sulfurique un complexe coloré, l'intensité de sa couleur est proportionnelle à la concentration des lipides totaux dans les échantillons (**Rifai *et al.*, 1999**).

- **Mode opératoire**

	Blanc	Étalon	Échantillon
Étalon (µl)	-	100	-
Échantillon (µl)	-	-	100
acide sulfurique (µl)	-	2500	2500

- **On mélange et on incube les tubes préparés pendant 10 min au bain marie à 100°C.**

	Blanc	Étalon	Échantillon
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (µl)	1000	1000	1000
Étalon (µl)	-	50	-
Échantillon (µl)	-	-	50

Après incubation pendant 15 mn à 37°C, l'absorbance (A) des échantillons est lu à 520 nm. La couleur est stable pendant une heure.

- **Calcul**

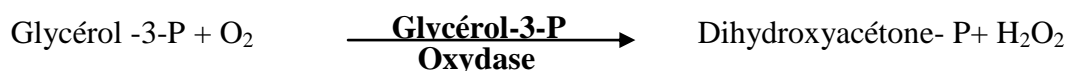
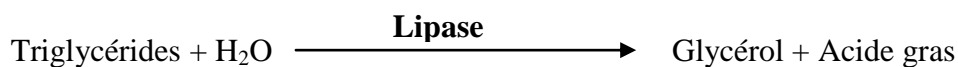
$$[\text{Lipides totaux}] \text{ (mg/dl)} = \frac{(A)_{\text{échantillon}}}{(A)_{\text{étalon}}} \times 750 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

## 3. Dosage des triglycérides

- **Principe**

Les triglycérides sont déterminés après une hydrolyse enzymatique par les lipoprotéines lipase (LPL). L'indicateur est une quinone formé à partir de l'hydrogène-peroxyde, le 4-aminophénazone (4-AP) et le P-chlorophénol sous l'influence catalytique

de la peroxydase (POD) (Fassati & Prencipe, 1982) ; selon les quatre réactions suivantes :



L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon.

- Mode opératoire**

	Blanc	Standard	Echantillon
Réactif (ml)	1,0	1,0	1,0
Standard (µl)	-	10	-
Echantillon (µl)	-	-	10

On mélange et on incube 5 min à 37°C ou 10 min à 15-25°C. La densité optique (DO) de l'échantillon et du standard est lue contre le blanc à 505 nm.

- Calcul de la concentration :** La concentration des triglycérides est calculée par la formule suivante :

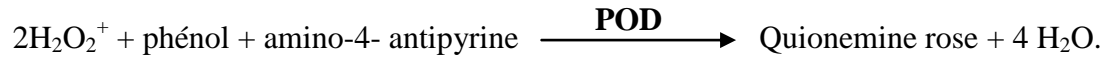
$$\text{Triglycérides (mg/ml)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO standard}} \times 200 \text{ (concentration du standard)}$$

#### 4. Dosage du Cholestérol total

- Principe**

Après hydrolyse enzymatique puis oxydation, l'indicateur quinoneimine formé à partir du peroxyde d'hydrogène et du amino-4-antipyrine en présence du phénol et de peroxydase permet la quantification du cholestérol (Rifai *et al.*, 1982), selon la réaction suivante :





La quantité de quinonemine formée est proportionnelle à la concentration de cholestérol.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon.

- **Mode opératoire**

	Blanc	Etalon	Echantillon
RT (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µl)	-	10	-
Echantillon (µl)	-	-	10

On mélange et on incube pendant 5 min à 37°C. La densité optique DO est lue à 505 nm contre le blanc. La coloration est stable pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.

- **Calcul de la concentration :** La concentration du cholestérol total est calculée par la formule suivante :

$$[\text{Cholestérol}] \text{ (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times 200 \text{ mg/dl (concentration de l'étalon)}.$$

### 5. Dosage des HDLc

- **Principe**

Les VLDL (Very Low Density Lipoproteins) et les LDL (Low Density Lipoproteins) sériques ou plasmatiques sont précipités par le phosphotungstate en présence des ions de magnésium. Après élimination par centrifugation du précipité, le supernatant est utilisé pour la détermination de l'HDL cholestérol (High Density Lipoproteins) (**Grove, 1979**).

- **Mode opératoire**

**La précipitation :** Dans un tube à centrifugation on met :

<b>R (µl)</b>	100
<b>Echantillon (ml)</b>	1,0

On mélange bien, on laisse agir pendant 10 min à une température ambiante. Après centrifugation à 4000 r.p.m. pendant 20 min ou 12000 r.p.m. pendant 2 min, on collecte les surnageants.

**Dosage des HDLc :** les instructions sont les mêmes pour le dosage du cholestérol total. (§7.6.4.).

- **Calcul de la concentration :** La concentration des HDLc est calculée par la formule suivante :

$$[\text{HDLc}] \text{ (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times 320 \text{ (concentration de l'étalon).}$$

### 6. Protéines totales

- **Principe**

Les liaisons peptidiques réagissent avec les sulfates de cuivre en milieu alcalin formant une coloration violette (bleu-violet) dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'échantillon (**Koller, 1984**)

- **Mode opératoire**

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µl)	-	25	-
Echantillon (µl)	-	-	25

On mélange et on incube pendant 5 min à 37°C, ou 10 min à une température ambiante. Les densités optiques des échantillons et de l'étalon sont lues contre le blanc à 540 nm. La coloration est stable pendant 30 minutes.

- **Calcul de la concentration :** La concentration des protéines totales est calculée par la formule suivante :

$$[\text{Protéines totales}] \text{ (g/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times 7 \text{ (concentration de l'étalon).}$$

### 7. Dosage de l'aspartate aminotransférase (AST/TGO)

- **Principe**

L'aspartate aminotransférase (AST) appelée aussi le glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine de l'aspartate au  $\alpha$ -cétooglutarate formant ainsi le glutamate et l'oxalacétate. L'oxalacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH (**Murray, 1984**).





Le taux de diminution de la concentration en NADH, mesuré par spectrophotométrie, est proportionnel à l'activité de l'AST présente dans l'échantillon.

- **Mode opératoire**

Réactif (ml)	1,0
Echantillon (µl)	100

On mélange et on incube pendant 1 min. La densité optique est lue à 340 nm chaque minute pendant 3 minutes.

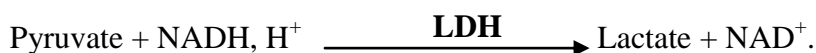
- **Calcul de l'activité**

$$\text{Activité AST (U/L)} = \frac{\Delta \text{DO}}{\text{Min} \times 1750}$$

### 8. Dosage de l'alanine aminotransférase (ALT/TGP)

- **Principe**

L'alanine aminotransférase (ALT) ou le glutamate pyruvate transaminase (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine de l'alanine au  $\alpha$ -cétoglutarate formant ainsi le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate est réduit au lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) et le NADH (Murray, 1984) :



Le taux de diminution de la concentration en NADH, mesuré par spectrophotométrie, est proportionnel à l'activité de l'alanine aminotransférase présente dans l'échantillon.

- **Mode opératoire**

Réactif (ml)	1,0
Echantillon (µl)	100

On mélange et on incube pendant 1 min. La densité optique est lue à 340 nm chaque minute pendant 3 minutes.

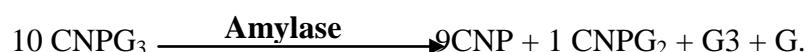
- **Calcul de l'activité**

$$\text{Activité TGP (U/L)} = \frac{\Delta \text{ DO}}{\text{Min} \times 1750}$$

### 9. Dosage des $\alpha$ amylases

- **Principe**

L' $\alpha$ -amylase hydrolyse le 2-chloro-4-nitrophényl- $\alpha$ -D-maltoïroside (CNPG<sub>3</sub>) en 2-chloro-4-nitrophénol (CNP), 2-chloro-4-nitrophényl- $\alpha$ -D-maltoside (CNPG<sub>2</sub>), maltotriose (G<sub>3</sub>) et glucose (G) selon la réaction suivante :



Le taux de formation du 2-chloro-4-nitrophénol, mesuré par spectrophotométrie, est proportionnel à la concentration catalytique des  $\alpha$  amylases présente dans l'échantillon (Neumann, 1984).

- **Mode opératoire**

	Echantillon
RT (ml)	1,0
Echantillon (µl)	20

On mélange et on incube pendant 30 min. la densité optique (DO<sub>1</sub>) est lue à 405 nm après 1 min et la densité optique (DO<sub>2</sub>) après 3 min.

- **Calcul de concentration**

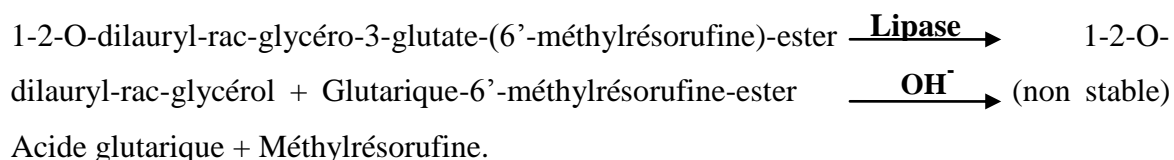
$$[\alpha\text{-Amylases}] \text{ (U/l)} = \Delta \text{ DO/min} \times 3954.$$

$$\Delta \text{ DO} = (\text{DO}_2 - \text{DO}_1).$$

### 10. Dosage des lipases

- **Principe**

La lipase pancréatique en présence de colipase, désoxycholate et les ions de calcium, hydrolyse le substrat 1-2-O-dilauryl-rac-glycéro-3-glutamate-(6'-méthylrésorufine)-ester. La séquence de réactions qui sont impliquées dans la détermination enzymatique directe de la lipase, sont les suivantes (Neumann, 1984) :



Le taux de formation du méthylrésorufine, mesuré par spectrophotométrie, est proportionnel à la concentration catalytique de la lipase présente dans l'échantillon.

- Mode opératoire**

	Blanc	Etalon / Echantillon
Réactif 1 (ml)	1,0	1,0
Réactif (μl)	200	200
Eau distillée (μl)	10	-
Etalon /Echantillon (μl)	-	10

On mélange et on incube à 37°C pendant 1 min. on effectue une lecture la densité optique initiale (DO) puis on lit chaque 1 min pendant 2 min.

On calcule la différence entre les densités et la moyenne des différences des densités par minute ( $\Delta DO/\text{min}$ ).

- Calcul de concentration**

$$[\text{Lipase}] \text{ (U/l)} = \frac{(\Delta DO/\text{min Echantillon} - \Delta DO/\text{min blanc})}{(\Delta DO/\text{min Standard} - \Delta DO/\text{min blanc})} \times \text{activité du standard}$$

### 11. Dosage de la créatinine

- Principe**

L'essai est basé sur la réaction de la créatinine avec les picrates de sodium. La créatinine réagit avec le picrate alcalin pour donner un complexe coloré, l'intervalle du temps choisi pour les dosages évite les interférences avec les autres constituants du sérum (Tietz, 1990).

L'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la concentration en créatinine de l'échantillon.

- Mode opératoire**

	Blanc	Etalon	Echantillon
<b>RT (ml)</b>	1,0	1,0	1,0
<b>Etalon (µl)</b>	-	100	-
<b>Echantillon (µl)</b>	-	-	100

On mélange, la densité optique (DO1) est lue à 492 nm après 30 secondes et la densité optique (DO2) après 90 secondes.

- Calcul de concentration**

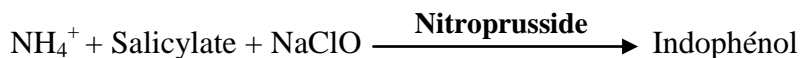
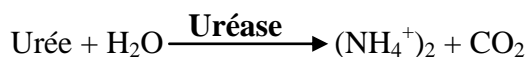
$$[\text{Créatinine}]_{(\text{mg/dl})} = \frac{\Delta\text{DO échantillon} - \Delta\text{DO blanc}}{\Delta\text{DO étalon} - \Delta\text{DO blanc}} \times 2 \text{ mg/dl (concentration de l'étalon).}$$

$$\Delta\text{DO} = \text{DO2} - \text{DO1}.$$

### 12. Dosage de l'urée

- Principe**

L'uréase hydrolyse l'urée en ammoniacque ( $\text{NH}_4^+$ ) et dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ). Les ions d'ammoniacque réagissent avec le Salicylate et l'hypochlorite ( $\text{NaClO}$ ), en présence du Nitroprusside pour former un indophénol vert (**Kaplan, 1984**), selon les réactions ci-dessous :



L'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la concentration d'Urée dans l'échantillon.

- Mode opératoire**

	Blanc	Etalon	Echantillon
<b>Réactif (ml)</b>	1,0	1,0	1,0
<b>Etalon (µl)</b>	-	10	-
<b>Echantillon (µl)</b>	-	-	10

On mélange et on incube pendant 5 min à 37°C, ou 10 min à 15-25°C.

- On ajoute

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif 2 (ml)	1,0	1,0	1,0

On mélange et on incube pendant 5 min à 37°C, ou 10 min à 15-25°C.

Les densités optiques de l'échantillon et de l'étalon sont lues contre le blanc à 580 nm. La coloration est stable pendant 30 minutes à 15-25°C.

- Calcul de la concentration**

La concentration de l'urée est calculée par la formule suivante :

$$[\text{Urée}] \text{ (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times 50 \text{ (concentration de l'étalon).}$$

### 13. Dosage de l'acide urique

- Principe**

L'acide urique est oxydé par l'uricase pour donner l'allantoïne et le peroxyde d'hydrogène (2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ce dernier forme, sous l'influence du POD, du 4-aminophénazone (4-AP) et 2-4 Dichlorophénol sulfonate (DCPS), un composé rouge de quinoneimine (Fassati *et al.*, 1980).



L'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la concentration d'acide urique dans l'échantillon.

- Mode opératoire**

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µl)	-	25	-
Echantillon (µl)	-	-	25

On mélange et on incube pendant 5 min à 37°C, ou 10 min à 15-25°C. Les densités optiques des échantillons et de l'étalon sont lues contre le blanc à 520 nm. La coloration est stable pendant 30 minutes.

- **Calcul de la concentration**

La concentration de l'acide urique dans le sérum ou le plasma est calculée par la formule suivante :

$$[\text{Acide urique}] \text{ (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times 6 \text{ (concentration de l'étalon)}.$$

*ANNEXE 02*

*PUBLICATION ET  
COMMUNICATION*



Research Article

ISSN : 0975-7384  
CODEN(USA) : JCPRC5

## Evaluation of the quality and *in vivo* therapeutic efficacy of a generic Glimepiride manufactured in Algeria, compared to the brand name drug Amarel on alloxan diabetic rats

Meryem Ouazouaz, Meriem Derradj and Cherifa Henchiri\*

Laboratory of Applied Microbiology and Biochemistry, Department of Biochemistry, Badji-Mokhtar University, Annaba, Algeria

---

### ABSTRACT

The present study aims to evaluate physicochemical characteristics and the effectiveness of pharmacological effects of a Glimepiride generic product, compared to its originator Amarel a sulfonylurea used to treat type 2 diabetes mellitus. Two doses 2 and 4 mg per day were tested on male albino rats diabetics with alloxan. Body weights, glycemia, HbA1c, lipid profile, total protein, the activity of certain enzymes and some renal parameters were determined. The results showed that physicochemical characteristics are compliant with standards of the American Pharmacopeia compared with the used reference substance. However, the biological study revealed a dose-dependent effect of Amarel on body weights, blood glucose and lipid profile of rats during and after the treatment, which was not obtained with the generic. Total protein and enzymes activities of serum transaminases, amylase and lipase were almost identical in groups treated with 4 mg of originator and generic. The 2 mg dose has not exerted the expected therapeutic effect. These results show that the studied generic exhibited less efficacy than the originator despite compliance of physicochemical characteristics. A supply of the generic with the aqueous extract of a local medicinal plant (*Zygophyllum cornutum*) was performed where the results of measuring blood glucose before and after sacrifice of rats were similar to those of healthy controls. No significant difference was recorded for renal parameters in all treated groups.

**Keywords:** Generic; Branded drug; Glimepiride; Alloxan diabetes.

---

### INTRODUCTION

Type 2 diabetes, a chronic widespread disease, is one of the major challenges of the 21<sup>st</sup> century in terms of health and development, WHO estimates that diabetes, has reached critical levels, each year, not less than four million people die of diabetes and about ten million are suffering from other disabilities and life-threatening complications [1]. The goal of treatment is to target glycemic control by maintaining hemoglobin glycated (HbA1c) as close to normal as possible while avoiding hypoglycemia.

Glimepiride, an oral sulfonylurea, indicated for the treatment of type 2 diabetes, it acts by stimulating the release of insulin in  $\beta$  cells of the pancreatic islets. This action is not glucose-dependent, it can lead to hypoglycemia. Stimulation occurs by closing the potassium channels of the  $\beta$  cell membrane, allowing the opening of calcium channels and the entry of calcium into the cell, thereby stimulating insulin secretion. Glimepiride also increases the number of active glucose transport molecules, the sensitivity of extra-pancreatic tissue is then raised (adipocytes, myocytes) and the speed of action of glucose slowed. Finally, it decreases the uptake of insulin by the liver by inhibiting gluconeogenesis [2].

Although the generic of a drug (originator or original molecule), are considered by the legislation as a medication that has the same qualitative and quantitative composition in active ingredient, the same pharmaceutical form, and



which the bioequivalence with the branded name product is demonstrated by bioavailability studies [3]. The effectiveness of these drugs is still questioned by physicians, as well as by patients; however, their prescription is increasing worldwide [4]. In addition, due to the high cost of drugs, Algeria, like all developing countries, has opted for generic drugs, by importing or producing these drugs, instead of original medicines protected by patents in developed countries [5].

This study aims to verify the antidiabetic effect of a glimepiride generic product, manufactured by a national pharmaceutical company and marketed in Algeria, and to evaluate its effectiveness in two different doses, recommended in glimepiride dosage, 2 and 4 mg per day, compared to the brand Amarel. This, leads to confirm the supposed effect of generic and to eliminate doubt on their supposed lack of efficacy compared to the originator [6], it will permit doctors to prescribe and patients to use generic drugs instead original drugs with confidence and avoid unnecessary costs, which will allow access to treatment for the poorest patients.

## EXPERIMENTAL SECTION

### Pharmaceuticals

In this study, we used Amarel the branded product of the molecule glimepiride and one of its generic manufactured in a national Algerian company, the two products were commercially purchased.

### Biological material

Wistar albino male rats (180 - 200 g) were purchased from Pasteur institute of Algiers. They were separated and divided into groups of 6 rats per cage with access *ad libitum* to water and a standard diet for rats (UAB: National unit of animal feed, Bejaia). They were also kept and maintained under laboratory conditions of temperature and light ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$  and 12 h light/dark cycle) respectively and strict hygiene for a few days, for acclimatization. The experiments were performed according to the guidelines of the Guide for Care and Use of Laboratory Animals [7].

### Laboratory quality control testing

The determination of the physicochemical properties of the two drugs, Amarel and the generic, were performed according to the American Pharmacopoeia (Active ingredient assay, dissolution test and disintegration time) [8, 9].

**Assay:** The analysis was performed on Waters e2695 HPLC system equipped by a binary pump, an UV/Vis Waters 2489 Detector and column (4mm x 12.5 cm, packing L1). The retention time of the major peak in the chromatogram of the Assay preparation corresponds to that in the chromatogram of the Standard preparation, as obtained in the Assay.

Mobile phase consisted of phosphate buffer at pH of 2.1 to 2.7 and acetonitrile at equal volumes. The diluent was a mixture of acetonitrile and water (9:1). A standard solution of glimepiride reference standard (RS) at 0.1 mg/ml concentration was used as reference. Assay preparation: five Tablets were transferred into a suitable volumetric flask to prepare a solution of approximately 0.1 mg/ml of glimepiride. 10 % of the volume of the flask was filled with water. About 70 % of the volume of the flask of acetonitrile was added. The samples were sonicated in a water bath for 5 to 10 minutes with occasional shaking. Acetonitrile was added to volume and the sample was mixed and filtered. 10  $\mu\text{l}$  of standard solution and samples were injected separately into the chromatograph at 1 ml/min flow rate and the eluent was measured at 228 nm. The percentage of the labeled amount of glimepiride ( $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$ ) in the portion of Tablets taken was calculated by the formula:  $100(C_S / C_U)(R_U / R_S)$ . In which  $C_S$ : the concentration, in mg/ml, of glimepiride in the Standard solution;  $C_U$ : the concentration of glimepiride in the sample; and  $R_U$  and  $R_S$  are the peak responses for glimepiride of the sample and the Standard solution, respectively.

**In vitro dissolution test:** The dissolution test was carried out according to USP Dissolution Test 1. The tablets were disposed separately in pH 7.8 phosphate buffer; 900 ml for 15 min at  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  at 75 rpm, using SOTAX AT 7 Smart 1022-197 Dissolutest. The standard solution was prepared as recommended in USP monographs to get a solution of 0.75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of glimepiride RS. After 15 min 10 ml of sample was withdrawn from the dissolution medium and was centrifuged for 5 min at 2500 rpm. To 3ml of the supernatant, 7ml of a mixture of methanol and water (1:1) was added to get the sample solution. The mobile phase was prepared as directed in the assay. 50 $\mu\text{l}$  of standard solution and the sample solution were injected separately in the same conditions of assay.

**Disintegration time test:** Disintegration were carried out using SOTAX DT 2, 5023-016 disintegration tester using distilled water as disintegration medium at  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , six tablets were examined.

### Biological Study

We evaluated the antidiabetic effects of the two medications, brand and generic glimepiride product, on Wistar albino rats diabetics with alloxan. For the two drugs, the same batches were used in the quality control analysis, as well as in the biological study.

### Diabetes induction

The rats were treated by a single intraperitoneal injection of 150 mg / kg body weight of alloxan monohydrate (Sigma-Aldrich Co., USA) [10]. To ensure the installation of diabetes, we measured blood glucose of rats after 72 hours of alloxan injection, only rats with fasting glycemia greater than 300 mg/dl were selected for the rest of the study [11].

### Experimental protocol and animal treatment

Rats were randomly divided into 7 groups of 6 rats per cage (**Table 1**): two control groups (healthy and diabetics), 4 subgroups treated with 2 and 4 mg of the two drugs and a group treated with 2 mg of the generic supplemented by an aqueous extract of an antidiabetic plant according to the local traditional medicine.

Treatments were administered daily to rats by a single oral dose [12], for 32 days. The rats were weighed and their fasting blood glucose levels (FBG) were measured using an Accu-check glucometer every three days throughout the treatment period.

**Table 1: Experimental design**

Groups	Characteristics
HC	Healthy controls received water under the same conditions as other groups.
DC	Diabetic controls received water under the same conditions as other groups.
2mg-G	Diabetics treated with 2 mg of the generic drug in water.
2mg-A	Diabetics treated with 4 mg of the generic drug in water.
4mg-G	Diabetics treated with 2 mg of Amarel in water.
4mg-A	Diabetics treated with 4 mg of Amarel in water.
G+Plt	Diabetics treated with a morning dose of 2 mg of the generic in water and 80 mg/kg b.w. of the aqueous extract of the plant.

### Biochemical assay

At the end of experiment, overnight fasted rats were sacrificed; blood samples were immediately collected in labeled tubes. After centrifugation, the serum obtained will be used for assays of serum glucose, total cholesterol (TC), total lipids (TL), triglycerides (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDLc), high density lipoprotein cholesterol (HDLc) levels, the activity of serum aminotransferases GOT and GPT, amylase and lipase, and even the renal parameters; Glycated Hb was determined in whole blood. The assays were performed according to the supplier's specifications from the standard Kits. LDLc have been calculated using the following formula:  $LDLc = TC - (HDLc) - (TG/5)$  [13].

### Statistical analysis of results

The results were presented as mean plus or minus standard deviation (Mean  $\pm$  SEM). The statistical analysis was performed by one way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's or Tukey multiple comparisons tests using MINITAB 16 package. Level of significance was: Significant when  $P \leq 0.05$ ; highly significant when  $P \leq 0.01$  and very highly significant when  $P \leq 0.001$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

### Quality control of products

The in vitro analysis of the generic drug and the branded product Amarel are presented in **Table 2**.

Despite the compliance with USP standards [8, 9]; results obtained from glimepiride assay, disintegration time and dissolution test for the generic drug are inferior to those of Amarel.

**Table 2: Results of the quality control of the two glimepiride drugs**

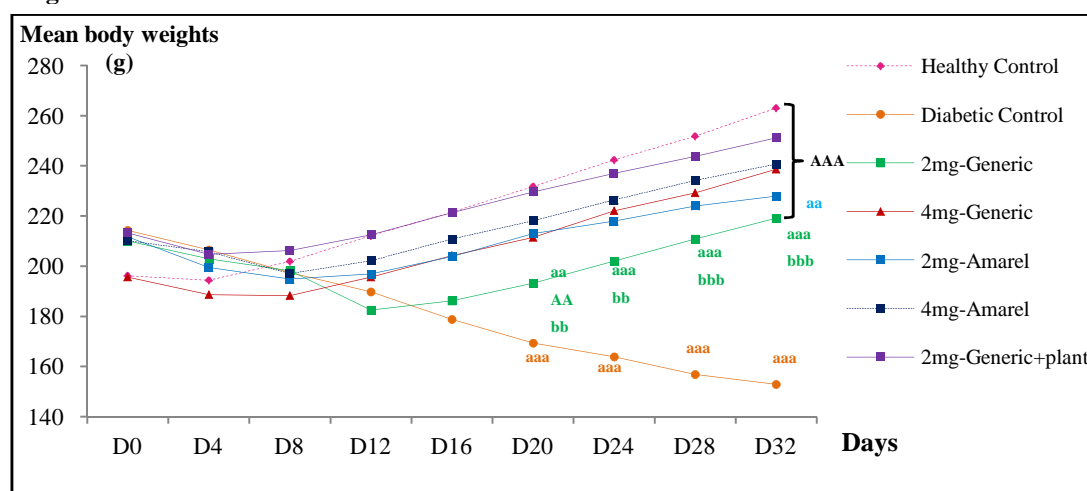
Analysis	USP limits	Amarel	Generic
Glimepiride assay (%)	90,0 - 110,0	109,8	107,0
Disintegration time (min)	$\leq 15$	3	1
Dissolution after 15 min (%)	$\geq 80$	98,4	82,7

*USP: United States pharmacopeia.*

### Changes in body weights and fasting glycemia before sacrifice

The following figures show the results of measurements of body weights and fasting blood glucose levels of animals monitored during the whole period of treatment.

#### Body weights



**Fig.1: Changes in body weights of rats during the whole period of treatment**

Vs HC: <sup>aa</sup>  $P \leq 0,01$ , <sup>aaa</sup>  $P \leq 0,001$ ; Vs DC: <sup>AA</sup>  $P \leq 0,01$ , <sup>AAA</sup>  $P \leq 0,001$ ; 2mg-G Vs 4mg-G: <sup>bb</sup>  $P \leq 0,01$ , <sup>bbb</sup>  $P \leq 0,001$ .

The results obtained (**Fig.1**) shows an increase in body weights of the healthy controls (HC) which is related to the normal growth of animals as well as a fall in weights of the diabetic controls (DC) which would be linked to metabolic disorders due to diabetes. The lack of insulin activates lipolysis in adipose tissue and would cause weight loss [14]; moreover, these animals received no treatment.

An increase in weights of the diabetic groups treated with the two doses of drugs has been observed, but it remains lower than that observed in healthy control rats, HC. This would suggest that both generic drug and Amarel have exerted a slight effect on insulin activity of the pancreas, resulting a slight lipogenesis, that allowed the recovery of body weights of rats, this weight gain is also due to normal growth of rats. Studies of the effect of glimepiride on body weight in diabetic man show that this medication is not associated with weight gain [2, 15].

While the group treated with the mixture, generic and plant extract (*Zygophyllum cornutum*), showed a better result similar to that of healthy controls.

#### Fasting blood glucose

Measurements of fasting blood glucose performed in the treatment period are shown in **Figure 2**; the healthy control group shows no change in blood glucose concentrations during 32 days of experiment.

However, in the diabetic control group, a very highly significant increase in blood glucose levels was observed (**29,74%**) during this period, which would be linked to the cytotoxic effect of alloxan on the pancreatic beta cells [16, 17], the lack of treatment of animals [18].

Diabetic groups, treated with 4 mg per day of generic and originator drugs show lower blood glucose levels of **57,52 %** and **60,53 %** respectively, this reduction is higher than that obtained by the dose 2 mg per day (**54,20 %** for the generic and **54,66 %** for Amarel). This reduction of the antidiabetic effect of the generic could be related to its active ingredient content which is lower to that of the originator (Table 2) or its excipient, different from that of the original, which could influence the release rate of the principle active [19]. The combination of the generic, at a rate of 2 mg per day, with the aqueous extract of *Zygophyllum cornutum* Coss, at a dose of 80 mg/kg, resulted in a significant decrease in blood glucose levels compared to the other used treatments and very highly significant compared to diabetic controls, DC (**72,67%**).

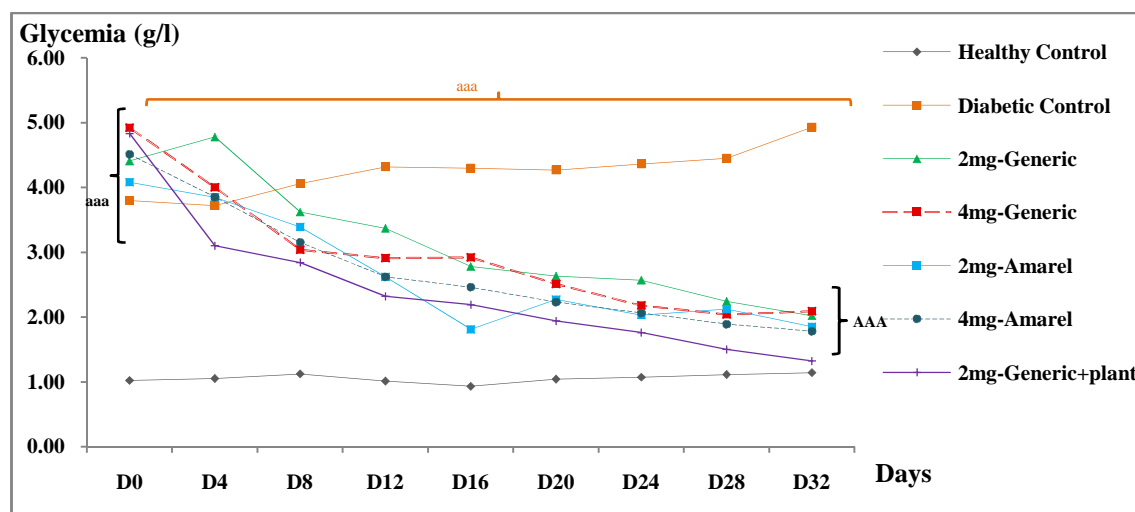


Fig.2: Changes in fasting glycemia of rats during the treatment period

Vs HC: <sup>aaa</sup>  $P \leq 0,001$ ; Vs DC: <sup>AAA</sup>  $P \leq 0,001$ .

### Biochemical parameters after sacrifice

Results of generic glimepiride effects, compared to Amarel, on some biochemical parameters, after sacrifice, (blood glucose, lipid profiles, enzymes activities and renal parameters) are presented in **Figures 3, 4, 5, 6** and **Tables 3, 4**.

### Glycemia and HbA<sub>1c</sub>

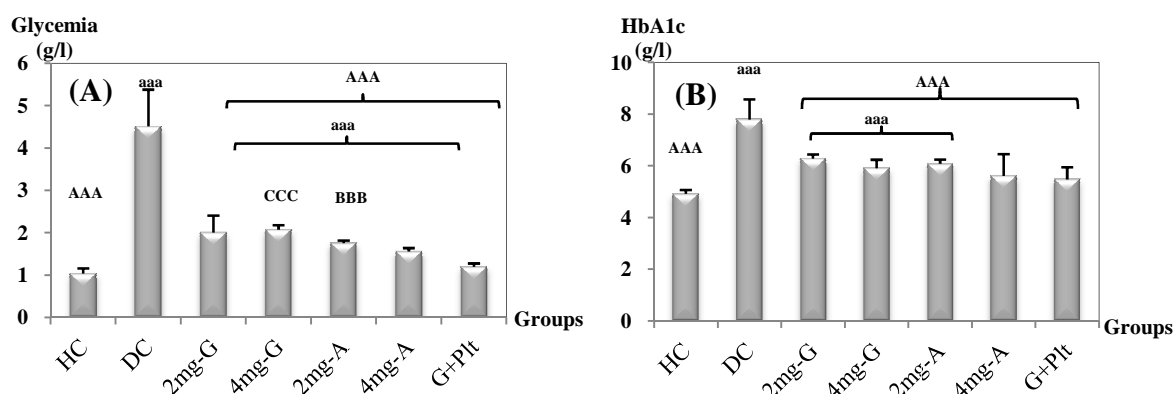


Fig.3: Evaluation of glycemia (A) and HbA<sub>1c</sub> levels (B) of rats after sacrifice

Vs HC: <sup>aaa</sup>  $P \leq 0,001$ ; Vs DC: <sup>AAA</sup>  $P \leq 0,001$ ; 2 mg-A Vs 4 mg-A: <sup>BBB</sup>  $P \leq 0,001$ ; 4 mg-G Vs 4 mg-A: <sup>CCC</sup>  $P \leq 0,001$ .

The results obtained after 32 days of treatment (**Fig.3 A**) show a high level of blood glucose in diabetic controls compared to healthy ones, which could be the result of diabetes [18]. In contrast, treatment with glimepiride exhibited a decrease in blood glucose levels in all treated groups [20]; this reduction remains relatively elevated compared to the healthy control group. We noted a dose-dependent effect of Amarel; indeed a very highly significant difference was observed between fasting glycemia in rats treated with 2 mg (1,76 g/l) compared to those treated with 4 mg (1,56 g/l). Whereas, for the two doses of generic, we noticed no significant difference between the glucose levels (2,01 g/l for the 2 mg dose and 2,08 g/l for the 4 mg dose). Only the mixture drug-plant extract revealed an hypoglycemic effect higher than that obtained in treated groups by both drugs; glucose levels observed in this group are similar to those of HC. This result was also obtained with glycemia before sacrifice.

The follow-up of HbA<sub>1c</sub> in diabetics reflects the glycemia stability over a given period (three months in human), allows to evaluate the effectiveness of treatments and is even used for predicting of dyslipidemia risks in the human diabetes [21]. HbA<sub>1c</sub> levels observed in treated groups are in the range of 5,62 to 6,28 % and are in accordance with decreases in fasting glucose levels before and after sacrifice of animals (**Fig.3 B**) showing also efficacy of these treatments. However, HbA<sub>1c</sub> levels are very elevated in untreated diabetics DC having very highly significant differences compared to healthy controls and treated groups; this increase is associated to high concentrations of blood glucose in this group [22]. Animals treated with all doses of the generic or the branded drug revealed no significant differences between their glycated Hb levels, but these values are slightly higher than the HC ones.

Supplementation of the generic by the plant extract seems to have the most potent effect on blood glucose and HbA<sub>1c</sub> levels. This result is similar to those found by other authors [23, 24], which have shown that the combination of a low dose of certain anti-diabetic agents combined with a dose of herbal extracts could assure a good glycemic control.

### Lipid profile

Table 3: Results of lipidic parameters assessment

Parameters Groups	TG (g/l)	LT (g/l)	CT (g/l)	LDLc (g/l)	HDLc (g/l)
HC	1,49 ± 0,14	1,91 ± 0,25	1,22 ± 0,09	0,81 ± 0,16	1,36 ± 0,28
DC	aaa 3,97 ± 0,30	aaa 8,43 ± 0,58	aaa 2,36 ± 0,37	a 1,41 ± 0,62	aa 0,90 ± 0,18
2mg-G	aaa AAA 2,32 ± 0,27	aaa AAA 4,11 ± 0,47	aa A 1,68 ± 0,46	a 1,26 ± 0,47	A b 1,27 ± 0,32
2mg-A	aa AAA cc 1,86 ± 0,23	aaa AAA 4,16 ± 0,63	AAA 1,42 ± 0,41		A BB 1,33 ± 0,35
4mg-G	aaa AAA b 1,98 ± 0,21	aaa AAA 4,35 ± 0,24	aa AAA 1,46 ± 0,21	0,82 ± 0,31	AAA CC 1,61 ± 0,14
4mg-A	aa AAA 1,76 ± 0,15	aaa AAA 4,52 ± 0,79	AAA 1,42 ± 0,35	A 0,73 ± 0,33	aaa AAA 1,95 ± 0,14
G+Plt	AAA 1,52 ± 0,08	aaa AAA 4,47 ± 0,09	AAA 1,40 ± 0,20	0,87 ± 0,25	aa AA 1,83 ± 0,14

Vs HC: <sup>a</sup>  $P \leq 0,05$ , <sup>aa</sup>  $P \leq 0,01$ , <sup>aaa</sup>  $P \leq 0,001$ ; Vs DC: <sup>A</sup>  $P \leq 0,05$ , <sup>AA</sup>  $P \leq 0,01$ , <sup>AAA</sup>  $P \leq 0,001$ ; 2mg-G Vs 4mg-G: <sup>b</sup>  $P \leq 0,05$ ; 2mg-P Vs 4mg-P: <sup>BB</sup>  $P \leq 0,01$ ; 2mg-G Vs 2mg-P: <sup>cc</sup>  $P \leq 0,01$ ; 4mg-P Vs 4mg-G: <sup>CC</sup>  $P \leq 0,01$ .

According to the results, there was a very highly significant increase in the concentration of TG in the DC group compared to HC (Table 3), which is linked to the insulin-deficiency responsible for lipolysis in adipose tissue [18]. In all treated groups, the rate of TG is reduced, indicating a hypolipemic effect of Glimepiride [25]. We also observed a concentration of TG in the group treated with the mixture of the generic- plant extract similar to that of healthy control one, this result has been obtained previously with glucose and HbA<sub>1c</sub>.

Very high levels of total cholesterol (TC), LDLc and total lipids (TL) in diabetic control rats (DC) were obtained, compared to healthy controls. In contrast, all treated groups have lower rates than DC group, with very highly significant differences.

The measurement of HDLc, revealed a lower serum level in the DC group compared to HC, with highly significant difference. This concentration in the group treated with 2 mg of Amarel (2mg-A) is similar to that of healthy control one. Compared to healthy and diabetic controls, 4mg-A and G+plt groups exhibited high levels of HDLc, with very highly significant differences. These results are in agreement with those reported by Araki et al. [26]; studying the effect of Glimepiride on increasing rates of HDLc.

### Total proteins

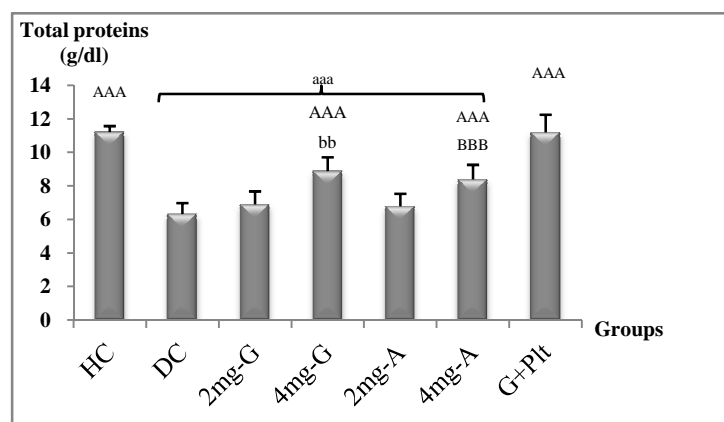


Fig. 4: Evaluation of total proteins in rats at the end of the experiment

Vs HC: <sup>aaa</sup>  $P \leq 0,001$ ; Vs DC: <sup>AAA</sup>  $P \leq 0,001$ ; 2mg-G Vs 4mg-G: <sup>bb</sup>  $P \leq 0,01$ ; 2mg-A Vs 4mg-A: <sup>BBB</sup>  $P \leq 0,001$ .

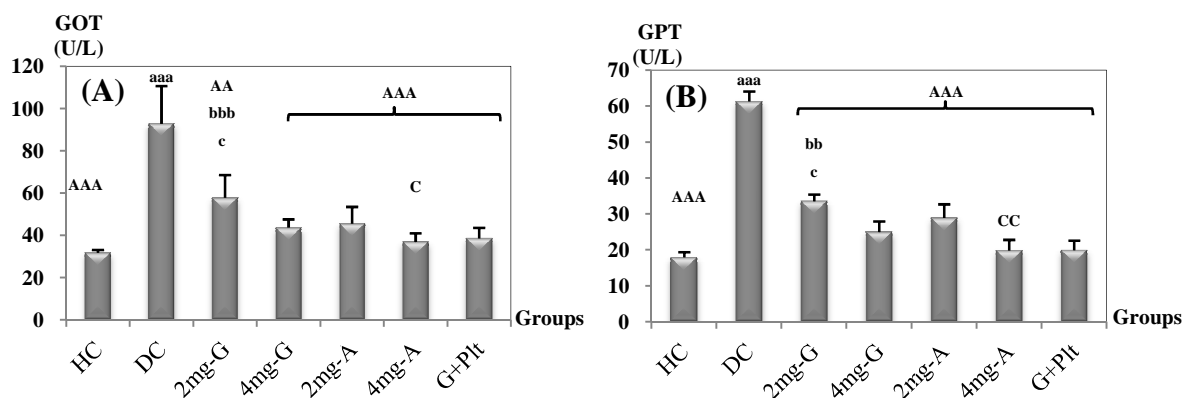
The results presented in Figure 4 indicate a rate of total serum proteins in untreated diabetic rats lower than that of healthy controls, with a very highly significant difference. This could be due to a loss in the urine (proteinuria)

related to a long lasting hyperglycemia [27], to the toxic action of alloxan on the kidneys [28] or the result of increased protein catabolism associated with insulin deficiency [29].

Total proteins of treated groups with 4 mg of both drugs are similar to each other but remain lower than those of HC, whereas proteins of the group treated by mixing drug-extract are similar to those of the HC.

### Enzymatic activities

#### • Serum aminotransferases



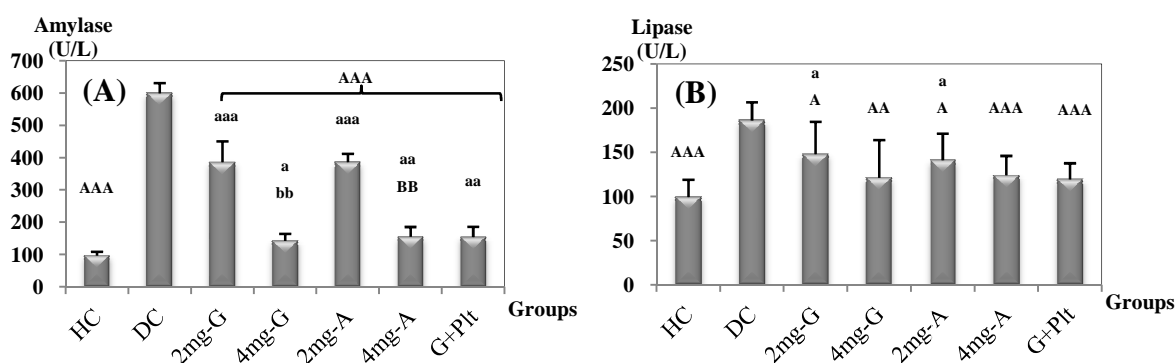
**Fig. 5: Evaluation of serum transaminases GOT (A) and GPT (B) in rats after the treatment period**

Vs HC : <sup>aaa</sup> $P \leq 0,001$ ; Vs DC: <sup>AA</sup> $P \leq 0,01$ , <sup>AAA</sup> $P \leq 0,001$ ; 2mg-G Vs 4mg-G : <sup>bb</sup> $P \leq 0,01$ , <sup>bbb</sup> $P \leq 0,001$ ; 2mg-G Vs 2mg-A : <sup>c</sup> $P \leq 0,05$ ; 4mg-G Vs 4mg-A: <sup>c</sup> $P \leq 0,05$ , <sup>cc</sup> $P \leq 0,01$ .

A very highly significant increase in the activity of serum aminotransferases in diabetic control rats was observed compared to healthy controls. The high enzymatic activity of GOT and GPT can be explained by the hepatotoxic effect of alloxan [28, 30]. In contrast, treatment of diabetic rats by Amarel and its generic revealed decreased activities of these two enzymes, with very highly significant differences compared to DC (Fig.5).

These activities were higher in the group treated by 2 mg of the generic compared to the group treated with 4 mg, with a highly significant difference ( $P \leq 0.01$ ). While, both doses of Amarel showed no significant differences. The treatment resulted in a reduction in the activity of these two enzymes and therefore, exerted a protective effect against liver damage caused by alloxan; the best effect was obtained with the 4 mg dose of Amarel and the combination of the generic with the plant extract.

#### • Serum amylase and lipase activity



**Fig.6: Evaluation of serum amylase (A) and lipase (B) activities after sacrifice of rats after treatment**

Vs HC: <sup>a</sup> $P \leq 0,05$ , <sup>aa</sup> $P \leq 0,01$ , <sup>aaa</sup> $P \leq 0,001$ ; Vs DC: <sup>A</sup> $P \leq 0,05$ , <sup>AA</sup> $P \leq 0,01$ , <sup>AAA</sup> $P \leq 0,001$ ; 2mg-G Vs 4mg-G: <sup>bb</sup> $P \leq 0,01$ ; 2mg-A Vs 4mg-A: <sup>BB</sup> $P \leq 0,01$ .

The determination of amylase and serum lipase allows the diagnosis of pancreatic damage [31]. In diabetic controls, we noticed a very highly significant increase of serum amylase and lipase activities, compared to the healthy control group, suggesting an alteration of the pancreas caused by alloxan [32]. The 4 mg dose of both generic and even the combination of the generic with the plant extract caused very highly significant decreases in the activity of amylase (Fig.6 A), compared to diabetic controls ( $p \leq 0.001$ ). Reduced activities of serum amylase were also observed in diabetic groups treated with 2 mg of the two medicaments compared to DC group but remained elevated compared

to healthy controls ( $p \leq 0.001$  Vs HC). The lipase activity, in all treated groups was lower than that of DC; only the groups treated with 4 mg of both drugs and the mixture generic-plant showed decreases with highly significant differences for the generic and very highly significant for Amarel and the mixture, compared to DC (**Fig.6 B**).

### Renal parameters

Chronic hyperglycemia and dyslipidemia are associated with metabolic disorders in humans and animals with diabetes [32], which causes oxidative stress, resulting high levels of ROS [33]. Oxidative environments can cause damage in hepatic and renal cells and tissues [34]. High levels of urea and creatinine (indicators of renal dysfunction) observed in untreated diabetic rats (**Table 4**) would result from the action of ROS and the toxic effect of alloxan on the **kidneys** [28].

**Table 4: Evaluation of renal serum parameters in rats**

Parameters Groups	Uric acid (mg/dl)	Urea (g/l)	Creatinine (mmol/l)
HC	AA 2,58 ± 0,44	AAA 0,66 ± 0,08	AAA 63,64 ± 15,34
DC	3,37 ± 0,42	1,34 ± 0,36	aaa 111,68 ± 13,99
2mg-G	A 2,84 ± 0,21	AA 0,78 ± 0,18	NS 90,88 ± 28,84
2mg-A	A 2,80 ± 0,37	AA 0,70 ± 0,19	AA 75,03 ± 17,12
4mg-G	NS 3,05 ± 0,40	AA 0,80 ± 0,13	aa 97,56 ± 14,26
4mg-A	NS 2,99 ± 0,38	AAA 0,74 ± 0,07	A 87,16 ± 21,23
G+Plt	A 2,71 ± 0,57	AAA 0,67 ± 0,08	AAA 73,54 ± 14,10

Vs HC: <sup>aa</sup>  $P \leq 0,01$ , <sup>aaa</sup>  $P \leq 0,001$ ; Vs DC: <sup>A</sup>  $P \leq 0,05$ , <sup>AA</sup>  $P \leq 0,01$ , <sup>AAA</sup>  $P \leq 0,001$ ; <sup>NS</sup>: Not Significant.

The treatment was effective in improving these two parameters. No significant differences were observed between the different treatments for the three renal parameters studied.

### CONCLUSION

This study aimed to evaluate the pharmaceutical quality of a generic glimepiride, an oral antidiabetic agent, compared to the originator product Amarel, and to verify its effects, according to two selected doses namely 2 and 4 mg per day, in rats with alloxan diabetes. Despite the compliance of their physicochemical characteristics with American standards, the results of the biological study revealed: a recovery of body weights in rats treated with the mixture generic - plant, followed by groups treated with 4 mg of Amarel and the generic respectively. These results are in accord with those obtained for glycemia declines following different treatments (**Fig.2**). After sacrifice, the most important decreases of fasting glycemia and HbA1c levels were obtained with the combination “generic-plant extract”, and with doses 4 and 2 mg of Amarel. For the lipid profile, Amarel was more effective than the generic; and the mixture still shows a beneficial effect on these parameters. Total proteins and also enzymatic activities of serum transaminases, amylase and lipase were improved in groups treated with 4 mg of both drugs and the mixture. The different treatments exerted similar effects on serum urea, creatinine and uric acid. No toxic effects were observed in rats treated with the two drugs, Amarel and its generic product, at doses of 2 and 4 mg per day, during the period of treatment. The analyzed generic glimepiride exhibits lower therapeutic potency compared to the originator drug Amarel, which requires dose adjustment for treatments. According to this study, it is suggested to manufacturers to carry out studies on their finished generic products, in order to adjust the recommended doses to avoid overdosing or under dosing which could be dangerous for patients.

### Acknowledgments

This study was partly supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS) of Algeria (PNR, Health project 2011). Authors thank assistance of Inpha-Médis laboratories.

### REFERENCES

- [1] JC Mbanya. Global Diabetes Plan, **2011-2021**. International Diabetes Federation, **2010**. Available at: <http://www.idf.org/global-diabetes-plan-2011-2021>. Accessed: April 2012.
- [2] SN Davis. J. *Diabetes Complications*, **2004**, 18, 367-376.

- [3] F Claudot and Y Juillièrre. Les génériques: aspects juridiques, questions éthiques. Consensus Cardio pour le praticien, **2007**, 33, 26-28.
- [4] C Abelli. Générique humanitaires: intérêts et limites des cinétiques de dissolution dans le contrôle qualité des gélules. Application à la tétracycline et à l'indométacine. Pharm. thesis, Clermont-Fd, **1996**, 114. Available at: <http://www.chmp.org/html/publications.html>. Accessed: October **2012**.
- [5] MC Chemtob-Conce. Brevets pharmaceutiques et santé publique des pays en développement. Med. & Droit, **2005**, Vol **2005**(70), 23-27.
- [6] Ekaette Akpabio, Clement Jackson, Calister Ugwu, Mfon Etim and Mfon Udofia. *Nigeria. J. Chem. Pharm. Res.*, **2011**, 3(3):734-741.
- [7] Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8<sup>th</sup> edition. ISBN: 0-309-15401-4, **2010**, 1-248.
- [8] Glimepiride Tablets. Pharmacopeial Forum, 33(3), 411.
- [9] Glimepiride Tablets: Performance Tests/Dissolution/Test 1. USP 35–NF30, **2012**, 3335.
- [10] E Matteucci and O Giampietro. *J. Ethnopharmacol.*, **2008**, 115, 163-72.
- [11] A Boudjelal, C Henchiri, L Siracusa, M Sari and R Giuseppe. *Fitoterapia*, **2012**, 83, 286-292.
- [12] J Rosenstock, E Samols, DB Muchmore and J Schneider. *Diabetes Care*, **1996**, 19(11), 1194-9.
- [13] WT Friedewald, RI Levy, DS Fredrickson. *Clin. Chem.*, **1972**, 18, 499-502.
- [14] PK Prabhakar and M Doble. *Curr. Diabetes Rev.*, **2008**, 4, 291-308.
- [15] R Weitgasser, M Lechleitner, A Luger and A Klingler. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **2003**, 61, 13-19.
- [16] P Kemasari, S Sangeetha and P Venkatalakshmi, *J. Chem. Pharm. Res.*, **2011**, 3(5), 653-659.
- [17] GO Alade1, OR Omobuwajo1, CA Adebajo and EJ Verspohl. *J. Chem. Pharm. Res.*, **2011**, 3(2), 506-521.
- [18] PJ Guillausseau and M Laloi-Michelin. *Rev. Med. Interne*, **2003**, 24, 730-737.
- [19] H Bagheri. Génériques, équivalents thérapeutiques, copies, princeps: similitudes et différences. Réalités en Gynécologie-Obstétrique, **2009**, 14, 1-6.
- [20] E Draeger. *Diabetes Res. Clin. Pract. Suppl.*, **1995**, 28, S139-S146.
- [21] RV Mahato, P Gyawali, P Psd. Raut, P Regmi, K Psd. Singh, DR Pandeya and P Gyawali. *Biomed. Res.*, **2011**, 22(3), 375-380.
- [22] A Danish, S Manju, M Alok, WR Pramod and K Vikas. *Altern. Med.*, **2013**, 13, 10.
- [23] SL Badole and SL Bodhankar. *Eur. J. Integr. Med.*, **2009**, 1, 73-79.
- [24] M Yadav, A Lavania, R Tomar, G B K S Prasad, S Jain and H Yadav. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2010**, 160, 2388-2400.
- [25] Dan-yan Xu, Shui-Ping Zhao, Qiu-xia Huang, Wei Du, Yu-hua Liu, Ling Liu and Xiao-mei Xie. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **2010**, 88, 71-75.
- [26] T Araki, M Emoto, T Konishi, Y Ikuno, E Lee, M Teramura, K Motoyama, H Yokoyama, K Mori, H Koyama, T Shoji and Y Nishizawa. *Metab.*, **2009**, 58, 143-148.
- [27] SM Mauer, MW Steffes and DM Brown. *Am. J. Med.*, **1981**, 70, 603.
- [28] S Lenzen. *Diabetologia*, **2008**, 51, 216-226.
- [29] TP Almdal and H Vilstup. *Diabetologica*, **1988**, 31, 114-118.
- [30] M Rajan, V Kishor Kumar, P Satheesh Kumar, Kotam Reddy Swathi and Sangam Haritha. *J. Chem. Pharm. Res.*, **2012**, 4(6), 2860-2868.
- [31] H Niecheiles. *J. Natl. Med. Assoc.*, **1961**, 53(3), 225-228.
- [32] K Hamden, F Ayadi, K Jamoussi, H Masmoudi and A Elfeki. *Biofactors*, **2008**, 33(3), 165-175.
- [33] K Hamden, B Jaouadi, N Zarai, T Rebai, S Carreau and A Elfeki. *J. Physiol. Biochem.*, **2011**, 67(1), 121-128.
- [34] K Hamden, B Jaouadi, S Carreau, A Aouidet and A Elfeki. *Nat. Prod. Res.*, **2011**, 25(3), 244-255.