



AVIS DE SOUTENANCE DE THESE

Le Doyen de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz –Fès – annonce que

Mr AKHMOUCH Ahmed Amin
Soutiendra : **le Samedi 30/12/2023 à 10H00**
Lieu : **FSDM – Département de Géologie**

Une thèse intitulée :

**Développement préclinique et galénique de la nouvelle spécialité
pharmaceutique : « Amoxicilline-Acide clavulanique-Cinéole »**

En vue d'obtenir le Doctorat

FD : Molécules Bioactives Santé et Biotechnologie
Spécialité : Biotechnologie

Devant le jury composé comme suit :

Nom et prénom	Etablissement	Grade	Qualité
Pr REMMAL Adnane	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz USMBA, Fès	PES	Président
Pr OUMOKHTAR Bouchra	Faculté de Médecine, de Pharmacie et de Médecine Dentaire USMBA, Fès	PES	Rapporteur & Examineur
Pr ZEROUALI OUARITI Khalid	Faculté de Médecine et de Pharmacie UH2, Casablanca	PES	Rapporteur & Examineur
Pr LEGSSYER Abdelkhalek	Faculté des Sciences UM1, Oujda	PES	Rapporteur & Examineur
Pr LOQMAN Souad	Faculté de Médecine et de Pharmacie UCA, Marrakech	PES	Examineur
Pr CHAKIB BENJELLOUN Mohamed	Faculté de Médecine, de Pharmacie et de Médecine Dentaire USMBA, Fès	PES	Examineur
Pr CHAMI Najat	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz USMBA, Fès	PES	Directeur de thèse
Pr TANTAOUI ELARAKI Abdelghafour	Ex - Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat	PES	Invité



Résumé :

La médecine se trouve aujourd'hui confrontée à un problème grave de santé lié à l'acquisition de nouveaux caractères de résistance par des bactéries auparavant facilement détruites. Durant un demi-siècle (1930-1980), la recherche apportait régulièrement de nouvelles molécules qui contournaient ces résistances. Depuis, l'innovation dans ce domaine est pratiquement en panne. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) n'a cessé de tirer le signal d'alarme pour attirer l'attention sur la résistance bactérienne qui risque de mettre la médecine et l'humanité dans un état de Knock Out (KO).

Les équipes de recherche du laboratoire de biotechnologie (FSDM-Fès) ont mis au point une nouvelle alternative de lutte contre la résistance aux agents antibactériens qui a fait l'objet d'un brevet international. Cette alternative consiste en l'association des antibiotiques préexistants avec des composés majoritaires d'huiles essentielles connus pour leur puissant pouvoir antibactérien.

Ce travail avait comme objectif de concrétiser ces travaux de recherche par le passage à l'industrialisation de cette alternative en se focalisant sur un seul antibiotique, qui est l'amoxicilline.

La première partie de ce travail, réalisée au sein du laboratoire de biotechnologie (FSDM-Fès), a été marquée par l'utilisation de nouvelles méthodes dont les concentrations inhibitrices partielles (CIP) déterminées par une microtechnique de dilution en microplaque, le test des indices de fraction (FIC-index) et le test de cinétique de bactéricidie (Kill time assay). En utilisant ces différentes méthodes, nous avons évalué *in vitro* l'activité antibactérienne de l'Amoxicilline associée à un des trois composés majoritaires d'HE qui sont le 1,8-cinéole, le carvacrol et l'eugénol vis-à-vis de six souches bactériennes multirésistantes, productrices de BLSE et isolées en milieu hospitalier (trois souches d'*Escherichia coli* et trois souches de *Klebsiella pneumoniae*). Les résultats obtenus ont démontré une forte synergie d'action.

En prenant comme exemple l'action enzymatique des bactéries sur les antibiotiques de la famille des β -lactamines par la production de β -lactamases, un test enzymatique a été mis au point, en milieu gélosé et en milieu liquide, afin d'étudier le mécanisme d'action de cette forte synergie. Ce test consistait à voir l'action de la β -lactamase sur l'amoxicilline quand elle est associée à un des composés majoritaires testés. Les résultats obtenus ont démontré que cette association empêche la β -lactamase d'hydrolyser le cycle β -lactame de l'amoxicilline. Ceci pourrait s'expliquer par la formation d'une nouvelle entité appelée « Amoxicilline boostée », qui en plus de son puissant pouvoir antibactérien vis-à-vis des souches multi-résistantes et productrices de BLSE, a une très faible affinité pour la β -lactamase ce qui empêchera la sélection de nouveaux germes résistants.

La deuxième partie de ce travail, réalisée entre le laboratoire de biotechnologie (FSDM- Fès) et le laboratoire de recherche et développement (Laboratoires pharmaceutiques SOTHEMA-Maroc), avait pour objectif d'évaluer *in vivo* la pharmacocinétique et *in vitro* la pharmacodynamique de l'amoxicilline boostée avec le 1,8-cinéole en utilisant un modèle animal (Lapin). L'étude *in vivo* consistait à comparer les profils pharmacocinétiques de deux formulations après administration chez le lapin. La première formulation contenait l'amoxicilline boostée et la deuxième contenait l'amoxicilline seule. L'étude *in vitro* consistait à étudier l'activité antibactérienne des plasmas et liquides céphalorachidiens des lapins traités. Les résultats des deux études *in vivo* et *in vitro* ont démontré une supériorité de l'amoxicilline boostée en termes de pharmacocinétique et de pharmacodynamique. Nous avons donc démontré que l'amoxicilline boostée aura un effet thérapeutique meilleur grâce, d'une part, à l'absorption plus rapide de l'amoxicilline, sa concentration plasmatique plus importante et le prolongement de sa demi-vie d'élimination, et d'autre part au puissant pouvoir antibactérien résultant de son association avec le 1,8-cinéole.

La troisième partie de ce travail a été réalisée au sein des laboratoires pharmaceutiques SOTHEMA-Maroc. Cette étape a constitué une transition d'échelle entre la recherche fondamentale et l'industrialisation. Nous avons mené à bien le développement analytique et galénique de la spécialité pharmaceutique « Amoxicilline boostée » dénommée « OLIPEN®, Amoxicilline-Acide Clavulanique-Cinéol », ainsi que les essais de stabilité nécessaires. Enfin, nous avons soumis le dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour cette spécialité.

En plus de la soumission de la demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM), nous avons élaboré un dossier complet comprenant l'ensemble des résultats obtenus, que nous avons soumis aux autorités compétentes. Ce dossier a été examiné et approuvé par le comité d'éthique, ce qui nous a permis d'obtenir l'autorisation de procéder à l'essai clinique.

Mots clés :

Résistance bactérienne, Antibiotiques, Amoxicilline, Huiles essentielles, Composés majoritaires, 1,8-cinéole, Carvacrol, Eugénol, synergie, β -lactamase, Mécanisme d'action, Amoxicilline boostée, Pharmacocinétique, Pharmacodynamique, Développement analytique et galénique, Essais de Stabilité, AMM, Essai clinique.



PRECLINICAL AND GALENIC DEVELOPMENT OF THE NEW PHARMACEUTICAL SPECIALTY: «AMOXICILLIN-CLAVULANIC ACID-CINEOL »

Abstract:

Medicine is facing a serious health problem today due to the acquisition of new resistance characteristics by bacteria that were previously easily destroyed. For half a century (1930-1980), research regularly provided new molecules that bypassed these resistances. Since then, innovation in this field has been virtually at a standstill. The World Health Organization (WHO) has repeatedly sounded the alarm to draw attention to bacterial resistance, which could knock out medicine and humanity.

The research teams at the biotechnology laboratory (FSDM-Fez), have developed a new alternative to fight resistance to antibacterial agents that has been the subject of an international patent. This alternative consists of combining pre-existing antibiotics with major compounds of essential oils known for their powerful antibacterial properties.

The aim of this work was to industrialize this alternative by focusing on a single antibiotic, which is amoxicillin. The first part of this work, carried out at the biotechnology laboratory (FSDM-Fez), was marked by the use of new methods such as partial inhibitory concentrations (PIC) determined by a micro-dilution technique in a microplate, the fraction index test (FIC-index), and the bactericidal kinetics test (Kill time assay). Using these different methods, we evaluated *in vitro* the antibacterial activity of Amoxicillin associated with one of the three major EO compounds, which are 1,8-cineole, carvacrol, and eugenol, against six multi-resistant bacterial strains, producing BLSE and isolated in a hospital environment (three *Escherichia coli* strains and three *Klebsiella pneumoniae* strains). The results obtained demonstrated strong synergy of action.

Taking the enzymatic action of bacteria on β -lactam antibiotics as an example by producing β -lactamases, an enzymatic test was developed, in a gel and liquid medium, to study the mechanism of action of this strong synergy. This test consisted of observing the action of β -lactamase on amoxicillin when it is associated with one of the tested major compounds. The results obtained showed that this combination prevents β -lactamase from hydrolyzing the β -lactam cycle of amoxicillin. This could be explained by the formation of a new entity called "Boosted amoxicillin," which, in addition to its powerful antibacterial activity against multi-resistant and BLSE-producing strains, has a very low affinity for β -lactamase, which will prevent the selection of new resistant germs.

The second part of this work, carried out between the biotechnology laboratory (FSDM-Fez) and the research and development laboratory (SOTHEMA-Maroc pharmaceutical laboratories), aimed to evaluate the pharmacokinetics *in vivo* and pharmacodynamics *in vitro* of boosted amoxicillin with 1,8-cineole using an animal model (rabbit). The *in vivo* study consisted of comparing the pharmacokinetic profiles of two formulations after administration to the rabbit. The first formulation contained boosted amoxicillin, and the second contained amoxicillin alone. The *in vitro* study consisted of studying the antibacterial activity of plasma from treated rabbits. The results of both *in vivo* and *in vitro* studies demonstrated the superiority of boosted amoxicillin in terms of pharmacokinetics and pharmacodynamics. We have, therefore, demonstrated that boosted amoxicillin will have a better therapeutic effect, thanks, on the one hand, to the faster absorption of amoxicillin, its higher plasma concentration, and the prolongation of its elimination half-life and, on the other hand, to the powerful antibacterial activity resulting from its association with 1,8-cineole.

The third part of this work was carried out within the SOTHEMA-Maroc pharmaceutical laboratories. This stage constituted a scaling up transition between fundamental research and industrialization. We successfully carried out the analytical and galenic development of the specialty "OLIPEN®, Amoxicillin-Clavulanic Acid-Cineol", as well as the necessary stability tests. Finally, we submitted the Marketing Authorization Application (MAA) for this specialty.

In addition to the submission of the MAA, we elaborated a comprehensive file comprising all obtained results, which we submitted to the competent authorities. This file was reviewed and approved by the ethics committee, enabling us to obtain authorization to proceed with the clinical trial.

Key words:

Bacterial resistance, Antibiotics, Amoxicillin, Essential oils, Major compounds, 1,8-cineole, Carvacrol, Eugenol, Synergy, β -lactamase, Mechanism of action, Boosted amoxicillin, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Analytical and galenic development, Stability trials, Marketing Authorization Application, Clinical trial.