

*« Mon âme exalte le Seigneur,
Exulte mon esprit en Dieu mon Sauveur, (...)
Le Puissant fit pour moi des merveilles, Saint est son nom »*

Luc 1

Naître, c'est à la portée de tout le monde.....

Même moi je suis née !

*Mais il faut devenir, ensuite ! **Devenir***

Grandir, croître, pousser, grossir (sans enfler),

Muer (sans muter), mourir (sans blêmir), évoluer (en évoluant),

S'abonner (sans s'abêtir), durer (sans végéter), vieillir (sans trop rajeunir)

Et mourir sans râler, pour finir !

Un gigantesque programme ! Une vigilance de chaque instant...

Daniel PENNAC

Monsieur Malaussene

A Papa et Maman,

*Qui m'ont appris par la parole et par l'exemple que le travail
ennoblit l'homme.*

*Sans vous je ne serais rien. L'amour que vous me portez depuis
toujours, m'a donné confiance en la vie, en moi, et en l'avenir.*

*C'est en lui que je puise sans cesse la force de me battre et c'est
lui qui m'a guidé sur ce beau parcours où je franchis une
nouvelle étape aujourd'hui.*

*Pour l'investissement que vous avez fait, pour la confiance que
vous m'avez témoignée, pour le soutien que vous m'avez donné
tout au long de ces années,*

Je vous dédie cette thèse, que je considère comme la vôtre.

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...
Aussi c'est tout simplement que je dédie cette thèse :*

A mon *Alain*,

A mes Sœurs *Cons*, *Lina* et leurs Conjoints respectifs,

A ma *Alice*,

A mon *Jojo*,

A mes *Neveux* et *Nièces*,

Quel plaisir de vous avoir !

A Abbé *Jean-Marie Ndour*,

A la mémoire de ma marraine *Atya*,

A Tonton *Félix* et à Tata *Fato*,

*J'ai à peine senti la transition lorsque vous m'avez accueillie
chez vous lors de la mutation de mes parents hors du Sénégal.*

Profonde reconnaissance !

A ma marraine *Corinne*,

A mes *Oncles* et *Tantes*,

A mes Cousins et Cousines,

A Hélène,

Qui m'a si tendrement et si gentiment accompagnée tout au long de ce travail et supportée dans la dernière ligne, pas toujours aussi droite qu'on le prétend.

A Martine, Maguy, Soukeyna,

AU « Noyau Dur »,

Les meilleurs moments vécus ensemble, avec un groupement OH ou non, ne sont que les prémices de ceux qu'ils nous restent encore à partager.

A toute la Promotion « Cheikh Saad Bouk BOYE 2004 »,

A mes Amis Médecins,

Je conçois que vous ayez choisi la facilité.

*Ce n'est pas offert à tout le monde d'être **PHARMACIEN**.*

Santé !

REMERCIEMENTS

*Au terme de ce parcours qui est la thèse, je voudrais remercier le **Professeur Cheikh Saad Bouh BOYE** pour avoir endossé la responsabilité de cette recherche, pour la grande autonomie qu'il m'a accordée et pour la conviction de réponse que j'ai apprise auprès de lui. Sa culture et sa manière d'être scientifique et humaine resteront pour moi un terreau fertile à toute aventure de ce type.*

*De même j'exprime tous mes remerciements au **Personnel du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments**, tout autant pour le suivi (administratif et autres) que pour l'intérêt et le regard transdisciplinaire portés à l'étude.*

Bien plus qu'un parcours, la thèse s'apparente à fortiori, pour la randonneuse débutante que je suis, à une course en montagne. Elle offre entre autre la liberté d'orienter son chemin, de se diriger vers des " pics " de compétence dans des domaines aussi divers que variés.

*Je remercie aussi l'**Equipe du Laboratoire de Bactériologie – Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec**.*

Six années de petits pas, avec des hauts et des bas....

*Merci pour votre compagnonnage : **Adj, Marie, Néné, Ndèye Fatou, Aïcha, Max, Ndèye Daba**.*

*En parallèle des sentiers scientifiques, ces années ont été riches de détours et de croisements le long de la route. Merci à tous ceux avec qui j'ai partagé certaines étapes : **Sosso, Lydie, Olga, Saratou**.*

*Last but not least, mes compagnons de cordée : **Alfred, Bamba, Vieux, Michael, Pierrot, Bâ, Marcel**.*

A

NOS MAITRES

ET JUGES

A notre Maître et Président de Jury,

Le Professeur Doudou BA,

Vous nous avez honorée en acceptant de présider le jury de notre thèse.

La richesse de vos cours et leur clarté nous amènent à vous vouer une grande admiration.

Vous avez cultivé avec vos étudiants des relations précieuses basées sur le respect.

Votre modestie facilite le contact. Vous êtes une référence.

Soyez assuré de notre profonde gratitude et de nos sincères remerciements.

A notre Maître et Directeur de Thèse,

Le Professeur Cheikh Saad Bouh BOYE

Votre art de diriger, votre vision très claire des objectifs à atteindre ont facilité le travail que j'ai l'honneur de présenter.

Le flux continu de communication avec vos étudiants a instauré le grand climat de confiance qui nous galvanise et nous pousse vers l'excellence.

Vous êtes un infatigable pédagogue, toujours prêt à donner avec abnégation son savoir et ses conseils.

Les moments passés à vos côtés nous ont apporté tant sur le plan intellectuel et scientifique que sur le plan moral et éthique.

Professeur, Merci !

À notre Maître et Juge,

Le Professeur Mounirou CISS

Nous apprécions hautement votre rigueur dans le travail qui est source de notre réussite.

Votre exigence nous pousse à placer la barre très haut.

C'est cet apprentissage qui fera la différence dans notre vie active.

Nous vous en sommes reconnaissants.

À notre Maître et Juge,

Le Professeur Mamadou BADIANE,

Votre perception intuitive et votre discernement perspicace ont raison sur nos craintes et favorisent un climat sain avec vos étudiants.

Vous allez au-delà des apparences.

Vous sentez nos besoins, nos problèmes et nos attentes.

Nous vous renouvelons toute notre gratitude.

“Par délibération, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu’elle n’entend leur donner aucune approbation, ni improbation”.

SOMMAIRE

	PAGES
INTRODUCTION	1
 <u>PREMIERE PARTIE : GENERALITES SUR LES MEDICAMENTS ANTITUBERCULEUX</u>	
<u>CHAPITRE I : EPIDEMIOLOGIE DE LA TUBERCULOSE</u>	3
1. EPIDEMIOLOGIE DANS LE MONDE.....	3
2. EPIDEMIOLOGIE EN AFRIQUE.....	4
<u>CHAPITRE II : TRAITEMENT ET PRINCIPES DE BASE DU PROGRAMME NATIONAL DE LUTTE CONTRE LA TUBERCULOSE</u>	6
1. TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE.....	6
1.1. Principes du traitement de la tuberculose	6
1.2. Différentes étapes du traitement	6
1.3. Antibiotiques utilisés	7
1.4. Posologie des antituberculeux essentiels	7
2. LA LUTTE CONTRE LA TUBERCULOSE.....	8
<u>CHAPITRE II : LES ANTIBIOTIQUES ANTITUBERCULEUX</u>	10
1. LES ANTITUBERCULEUX MAJEURS	10
1.1. L'isoniazide (INH)	10
1.1.1. Structure	10
1.1.2. Caractères physico-chimiques.....	11
1.1.3. Mécanisme et spectre d'action.....	11

1.2. L'éthambutol (EMB)	11
1.2.1. Structure	11
1.2.2. Caractères physico-chimiques.....	12
1.2.3. Mécanisme et spectre d'action.....	12
1.3. La rifampicine (RMP)	12
1.3.1. Structure	12
1.3.2. Caractères physico-chimiques.....	13
1.3.3. Mécanisme et spectre d'action.....	13
1.4. Le pyrazinamide (PZA)	13
1.4.1. Structure	13
1.4.2. Caractères physico-chimiques.....	14
1.4.3. Mécanisme et spectre d'action.....	14
1.5. La streptomycine (SM)	14
1.5.1. Structure	14
1.5.2. Caractères physico-chimiques.....	15
1.5.3. Mécanisme et spectre d'action.....	15
2. LES ANTITUBERCULEUX DE « SECONDE INTENTION »	15
2.1. La ciprofloxacin (CP).....	15
2.1.1. Structure	15
2.1.2. Caractères physico-chimiques.....	16
2.1.3. Mécanisme et spectre d'action.....	16
<u>CHAPITRE II : METHODES DE DOSAGE ET DE</u> CONTROLE DES ANTIBIOTIQUES	17
1. DOSAGES MICROBIOLOGIQUES	17
1.1. Diffusion sur gélose	17
1.2. Turbidimétrie	18

2. DOSAGES IMMUNOLOGIQUES..... 18

3. CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES..... 19

CHAPITRE III : QUALITE DES MEDICAMENTS..... 21

1. LES CRITERES DE QUALITE..... 22

1.1. L'identité..... 22

1.2. La pureté..... 22

1.3. L'innocuité..... 22

1.4. L'activité..... 22

1.5. L'acceptabilité..... 22

1.6. L'uniformité..... 23

1.7. La biodisponibilité..... 23

1.8. La stabilité..... 23

1.9. La conservation ou conditionnement..... 23

**CHAPITRE IV : PROCEDURES ET DEFINITIONS DE
QUELQUES PARAMETRES DE
VALIDATION..... 24**

1. LINEARITE OU DOMAINE D'ANALYSE..... 26

2. LIMITE DE DETECTION..... 26

3. PRECISION..... 26

4. REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE..... 27

4.1. Répétabilité..... 27

4.2. Reproductibilité..... 28

5. SPECIFICITE..... 28

6. SENSIBILITE..... 29

7. EXACTITUDE OU JUSTESSE..... 29

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL

<u>CHAPITRE I : CADRE D'ETUDE</u>	30
<u>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES</u>	31
1. MATERIELS.....	31
1.1. Appareillage et verrerie	31
1.2. Réactifs et milieux de culture	32
1.2.1. Etalons de référence.....	32
1.2.2. Solvants.....	32
1.2.3. Milieux de culture.....	33
1.2.4. Souches de référence.....	34
1.2.5. Antituberculeux utilisés.....	34
2. TESTS PREALABLES DE STERILITE ET D'EFFICACITE.....	35
2.1. Tests de stérilité	35
2.1.1. Milieux de culture.....	35
2.1.2. Tampons.....	35
2.2. Tests d'efficacité	35
3. METHODES DE DIFFUSION SUR GELOSE.....	36
3.1. Principe	36
3.2. Mode opératoire	36
3.2.1. Préparation de la suspension bactérienne.....	36
3.2.1. Préparation de la gamme de dilution.....	36
3.2.3. Ensemencement du milieu.....	37
3.2.4. Application des disques.....	37
3.2.5. Expression des résultats.....	38
3.2.6. Standardisation.....	39

4. APPLICATIONS.....	40
4.1. Tests préliminaires de stérilité et d'efficacité.....	40
4.2. Dosage de la ciprofloxacine.....	40
4.2.1. Réactifs et milieu de culture.....	40
4.2.2. Mode opératoire.....	41
4.2.3. Titrage.....	41
4.2.4. Expression des résultats.....	42
4.3. Dosage de la streptomycine.....	42
4.3.1. Réactifs et milieu de culture.....	42
4.3.2. Mode opératoire.....	42
4.3.3. Titrage.....	43
4.3.4. Expression des résultats.....	43
4.4. Dosage de la rifampicine.....	43
4.4.1. Réactifs et milieu de culture.....	43
4.4.2. Mode opératoire.....	44
4.4.3. Titrage.....	44
4.4.4. Expression des résultats.....	45
4.5. Dosage de l'isoniazide.....	45
4.5.1. Réactifs et milieu de culture.....	45
4.5.2. Mode opératoire.....	45
4.5.3. Titrage.....	46
4.5.4. Expression des résultats.....	46
<u>CHAPITRE III : RESULTATS</u>.....	47
1. TESTS PREALABLES.....	47
1.1. Test de stérilité.....	47
1.1.1. Milieux de culture.....	47
1.1.2. Tampons.....	47

1.2. Test d'efficacité.....	47
2. RESULTATS DES ESSAIS PROPUREMENT DITS.....	47
2.1. Dosage des antituberculeux.....	48
2.1.1. Détermination de l'activité de la ciprofloxacine.....	48
2.1.2. Détermination de l'activité de la streptomycine.....	50
2.1.3. Détermination de l'activité de la rifampicine.....	52
2.1.4. Détermination de l'activité de l'isoniazide.....	54
3. EXPRESSION DES RESULTATS DE LA VALIDATION.....	56
<u>CHAPITRE IV : DISCUSSION</u>.....	63
CONCLUSION.....	73
BIBLIOGRAPHIE.....	76
ANNEXES.....	86

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u>	: Evolution de la notification de la tuberculose au SENEGAL, 1991 – 2002.....	5
<u>Tableau II</u>	: Doses optimales des médicaments antituberculeux essentiels.....	8
<u>Tableau III</u>	: Antituberculeux testés.....	34
<u>Tableau IV</u>	: Résultats du dosage de la ciprofloxacine.....	48
<u>Tableau V</u>	: Résultats du dosage de la streptomycine.....	50
<u>Tableau VI</u>	: Résultats du dosage de la rifampicine.....	52
<u>Tableau VII</u>	: Résultats du dosage de l'isoniazide.....	54
<u>Tableau VIII</u>	: Résultats du calcul des paramètres de validation de la ciprofloxacine.....	59
<u>Tableau IX</u>	: Résultats du calcul des paramètres de validation de la streptomycine.....	60
<u>Tableau X</u>	: Résultats du calcul des paramètres de validation de la rifampicine.....	61
<u>Tableau XI</u>	: Résultats du calcul des paramètres de validation de l'isoniazide.....	62

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u>	: Structure de l'isoniazide.....	10
<u>Figure 2</u>	: Structure de l'éthambutol.....	11
<u>Figure 3</u>	: Structure de la rifampicine.....	12
<u>Figure 4</u>	: Structure du pyrazinamide.....	13
<u>Figure 5</u>	: Structure de la streptomycine.....	14
<u>Figure 6</u>	: Structure de la ciprofloxacine.....	15
<u>Figure 7</u>	: Droite de régression de la ciprofloxacine.....	49
<u>Figure 8</u>	: Droite de régression de la streptomycine.....	51
<u>Figure 9</u>	: Droite de régression de la rifampicine.....	53
<u>Figure 10</u>	: Droite de régression de l'isoniazide.....	55

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR	:	Organisation Française de Normalisation
APHA	:	American Pharmaceutical Association
DOTS	:	Directly Observed Treatment Short-course
ISO	:	Organisation Internationale de Normalisation
LNCM	:	Laboratoire National de Contrôle des Médicaments
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
ONU	:	Organisation des Nations Unies
PNT	:	Programme National de Lutte contre la tuberculose

INTRODUCTION



L'Union Internationale contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires (UICTMR) a rêvé, surtout que les moyens d'y parvenir sont connus, de voir disparaître la tuberculose.

Il n'en est malheureusement rien et, en ce début de XXIème siècle, cette pathologie, avec plus de 5000 morts par jour, reste la maladie infectieuse curable qui provoque le plus grand nombre de décès dans le monde [47].

L'OMS s'est dite scandalisée de voir qu'en dépit de la disponibilité de médicaments bon marché et efficaces, autant de personnes continuent de mourir de la tuberculose.

En 2003, le Secrétariat de l'ONU Sida s'est joint officiellement à l'initiative « *Halte à la tuberculose* », un large partenariat lancé par l'OMS pour stopper la propagation de la tuberculose dans le monde.

La surveillance régulière de l'activité des antituberculeux est considérée comme un moyen objectif pour évaluer l'efficacité d'un Programme National de Lutte contre la Tuberculose.

En effet, plusieurs catégories de médicaments antituberculeux non conformes existent : malfaçons, contrefaçons et produits dégradés.

Leur fréquence, difficilement quantifiable, apparaît croissante et les pays en développement sont de loin les plus concernés. Les conséquences en terme de santé publique expliquent qu'un certain nombre de pays, encouragés par l'OMS, ont mis en place un système national de contrôle de qualité des médicaments antituberculeux.

Les difficultés rencontrées se situent dans l'évaluation de l'activité des agents antituberculeux, attestée par la multiplicité des méthodes proposées dans ce but : méthode d'étude *in vitro* et méthode d'étude *in vivo*.

Quelle que soit la méthode utilisée, la qualité des résultats rendus doit être avérée ; d'où la nécessité de travailler sur la base de protocoles validés.

L'objectif de la validation d'une méthode d'essai est de prouver de façon traçable, que cette méthode livre des résultats permettant de vérifier le respect de spécifications pré-établies.

Pour donner un élan à ce processus de validation, le Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (LNCM) donne la priorité à l'action.

Notre étude s'inscrit dans ce cadre et a pour but de valider l'essai *in vitro* de contrôle microbiologique de l'activité des antituberculeux essentiels par la technique de diffusion en milieu gélosé.

PREMIERE PARTIE

GENERALITES SUR LES MEDICAMENTS ANTITUBERCULEUX

CHAPITRE I : EPIDEMIOLOGIE DE LA TUBERCULOSE

[19] [28] [32] [33] [47] [51] [53]

L'étude épidémiologique de la tuberculose permet de mesurer l'ampleur et l'évaluation dans le temps du problème posé par cette affection. Elle contribue à décider des meilleures mesures collectives à mettre en place dans les pays selon les différents contextes épidémiologiques et à évaluer les résultats de leurs mises en œuvre.

1. EPIDEMIOLOGIE DANS LE MONDE

La tuberculose est une maladie contagieuse et la contamination inter-humaine s'effectue par voie aérienne.

Malgré la généralisation de la vaccination et la découverte d'autres agents antituberculeux très actifs, notamment l'isoniazide et la rifampicine, la tuberculose n'est toujours pas une pathologie du passé. Elle reste un problème de santé publique, trop longtemps négligé.

D'après les estimations de l'OMS, avec 10 millions de personnes nouvellement infectées chaque année et plus de 3 millions de décès par an, la tuberculose est la première cause de mortalité dans le monde liée à un agent infectieux unique: *Mycobacterium tuberculosis* exceptionnellement *Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium africanum*.

Plus de 90 % des tuberculeux vivent dans les pays les plus démunis. En raison de la couverture sanitaire insuffisante de la population, seule une partie de ces malades est détectée et traitée.

Dans les pays industrialisés, la tuberculose est redevenue d'actualité au début des années 1990, en raison de l'arrêt de la baisse de l'incidence. Les causes sont multifactorielles : dégradation des conditions socio-économiques touchant plus

particulièrement certaines populations, migration en provenance de pays à forte endémie tuberculeuse, baisse de la vigilance des professionnels de santé et effet amplificateur de l'épidémie VIH/Sida [12].

2. EPIDEMIOLOGIE EN AFRIQUE

Dans les pays en voie de développement, la tuberculose sévit sur un mode endémique. L'accroissement démographique, l'urbanisation rapide, l'absence ou l'implantation récente de programme national antituberculeux d'efficacité encore insuffisante, la survenue de l'épidémie VIH, expliquent l'augmentation de l'incidence déclarée de la tuberculose.

L'évolution galopante de cette maladie contagieuse peut s'expliquer également par des problèmes liés au retard apporté dans le diagnostic de la tuberculose, ce qui est à l'origine de sa large transmission [54].

Au Sénégal, l'incidence de la tuberculose est donnée par le tableau ci-dessous fournit par le PNT

**Tableau I : Evolution de la notification de la tuberculose au SENEGAL
1991-2002 [43]**

Année de déclaration	Nouveaux cas						Retraitement		Total des cas	Incidence / 100.000 habitants	
	TPM+		TPM-		TEP					NC TPM+	Total TB
	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre		
1991	4684	69,1	1122	16,5	375	5,5	600	8,8	6781	68,0	89,7
1992	5038	68,0	1334	18,0	357	4,8	679	9,2	7408	65,4	96,2
1993	4635	67,8	1270	18,6	285	4,2	652	9,5	6841	58,5	86,5
1994	4599	66,5	1173	17,0	433	6,3	708	10,2	6913	55,1	82,8
1995	5421	71,7	1073	14,2	504	6,7	563	7,4	7561	64,9	90,6
1996	5949	69,8	1255	14,7	642	7,5	679	8,0	8525	69,4	99,5
1997	5340	64,9	1385	16,8	787	9,6	710	8,6	8222	60,7	93,5
1998	5454	66,1	1433	17,4	938	11,4	650	7,9	8245	62,4	94,3
1999	5011	62,5	1421	17,7	669	8,3	920	11,5	8021	54	86,4
2000	5823	65,3	1370	15,4	800	9,0	931	10,4	8924	62,7	96,2
2001	6094	67,1	1243	13,7	790	8,7	959	10,6	9086	62,3	93
2002	5697	66	2259	14	828	10	904	10	9688	57	87

Source : Unité centrale du PNT du Sénégal

TPM+ : nombre de cas de tuberculeux pulmonaires positifs à l'ED

TPM- : nombre de cas de tuberculeux pulmonaires négatifs à l'ED

TEP : nombre de cas de tuberculeux extra-pulmonaires

NC : nombre de cas

TB : tuberculeux

CHAPITRE II : TRAITEMENT ET PRINCIPES DE BASE DU PROGRAMME NATIONAL DE LUTTE CONTRE LA TUBERCULOSE

1. TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE [14] [23] [42] [59] [63]

Le traitement de la tuberculose repose sur la polychimiothérapie. La durée de cette chimiothérapie a considérablement diminué depuis 1960 ; initialement de 18 à 24 mois, elle est actuellement de 6 à 8 mois et constitue « la chimiothérapie de courte durée ».

1.1. Principes du traitement de la tuberculose

Les conditions d'une chimiothérapie correcte sont :

- une **association** appropriée de médicaments antituberculeux pour éviter l'apparition d'une résistance à ces médicaments ;
- la prescription de médicaments à des **doses adéquates** ;
- leur **prise régulière** par le patient ;
- et ce, pendant un laps de **temps suffisant** pour prévenir les rechutes de la maladie après l'arrêt du traitement.

Le traitement sera prescrit à chaque patient dont la tuberculose a été confirmée et doit être **donné gratuitement** aux malades [2].

1.2. Différentes étapes du traitement

Le traitement des cas à frottis positifs doit toujours comprendre deux phases :

- la **phase initiale** « **intensive** » durant laquelle 3 à 4 (voire parfois 5) antibiotiques antituberculeux sont prescrits. Elle dure au moins deux

mois, et se poursuivra jusqu'à ce que les examens de crachats soient négatifs. Cette phase est la phase capitale de la chimiothérapie ;

- la **phase de continuation** durant laquelle le patient prend le plus souvent 2 médicaments antituberculeux. Sa durée doit être suffisamment longue pour permettre l'élimination de tous les bacilles.

1.3. Antibiotiques utilisés [29]

Vu le nombre limité de médicaments utiles pour le traitement de la tuberculose, il faut les utiliser avec beaucoup de soins pour éviter de créer des résistances à ces médicaments.

Les principaux médicaments utilisés sont l'isoniazide, la rifampicine, la pyrazinamide, l'éthambutol, la streptomycine et le thioacétazone. Certains médicaments sont disponibles en préparation combinées : la rifampicine avec l'isoniazide (RH), le thioacétazone avec l'isoniazide (TH) et l'éthambutol avec l'isoniazide (EZH).

1.4. Posologie des antituberculeux essentiels

Il existe un consensus international sur la posologie à utiliser pour chaque médicament antituberculeux en fonction du poids corporel (mg/kg) (**Tableau II**).

**Tableau II : Doses optimales des médicaments antituberculeux essentiels
(la fourchette est donnée entre parenthèses) [2]**

Médicaments	Dose quotidienne (en mg/kg)	Dose pour administration intermittente, 3 fois par semaine (en mg/kg)
Isoniazide	5 (4 – 6)	10 (8 – 12)
Rifampicine	10 (8 – 12)	10 (8 – 12)
Pyrazinamide	25 (20 – 30)	35 (30 – 40)
Ethambutol	15 (15 – 20)	30 (25 – 35)
Streptomycine	15 (12 – 18)	15 (12 – 18)
Thioacétazone	2,5 (2 – 3)	Non utilisé

2. LA LUTTE CONTRE LA TUBERCULOSE [35] [48] [50] [62]

L'objectif global de la lutte antituberculeuse est de réduire la mortalité et la morbidité de la tuberculose dans le monde en diminuant de façon significative la transmission de la maladie [2].

Afin d'atteindre cet objectif général, l'OMS a :

- adopté une nouvelle stratégie de lutte contre la tuberculose ;
- défini des objectifs spécifiques de lutte contre la tuberculose ;
- arrêté une série de mesures antituberculeuses devant être appliquées par tout pays désirant mettre en place un programme efficace de lutte contre la tuberculose.

La stratégie mondiale de lutte contre la tuberculose consiste à détecter en priorité les cas à microscopie positive et à les guérir par un traitement approprié et efficace

sous la forme d'une chimiothérapie de courte durée, sous supervision directe pendant au moins la phase initiale.

Cette stratégie « DOTS » permet de prévenir les résistances aux médicaments et, à long terme, de réduire, au sein d'une population donnée, l'importance de la maladie.

Au niveau mondial, les objectifs spécifiques fixés par l'OMS sont de :

- guérir 85 % des cas, à microscopie positive, dépistés ;
- dépister au moins 70 % des cas existant dans la collectivité.

Dans le cadre d'un Programme National Antituberculeux (PNT), le premier objectif doit être atteint avant d'envisager le taux de dépistage.

Les objectifs spécifiques et les priorités étant fixés, un programme ne peut être réalisé en pratique que si les moyens nécessaires à son application sont disponibles en permanence sur l'ensemble du territoire national et que son évaluation est assurée.

Le succès du programme est lié à la mise en œuvre de cinq mesures de lutte contre la tuberculose [2] :

- engagement politique des pouvoirs publics (*annexe 1*) ;
- détection des cas par un dépistage passif (*annexe 2*) ;
- traitement par une chimiothérapie de courte durée (*annexe 3*) ;
- approvisionnement régulier en médicaments (*annexe 4*) ;
- évaluation régulière des activités du programme grâce à un système permanent d'information (*annexe 5*).

CHAPITRE II : LES ANTIBIOTIQUES ANTITUBERCULEUX

[6] [22] [36] [37] [41] [44] [52] [60]

Les antituberculeux sont classés par l'OMS en fonction de leur activité antibactérienne et de leur toxicité pour l'homme en antituberculeux majeurs (les plus efficaces et les moins toxiques) et en antituberculeux de seconde ligne utilisés chez des patients porteurs de bacilles résistants aux antituberculeux majeurs.

Les antituberculeux majeurs comprennent l'isoniazide, l'éthambutol, la rifampicine, le pyrazinamide et la streptomycine.

Les antituberculeux de seconde ligne sont l'éthionamide, la D-cyclosérine, la capréomycine, le PAS ou para-amino-salicylique et les fluoroquinolones. Ces derniers possèdent des propriétés anti-mycobactériennes certaines, mais leurs activités restent en général inférieures à celles des antituberculeux majeurs.

1. LES ANTITUBERCULEUX MAJEURS

1.1. L'isoniazide (INH)

1.1.1. Structure

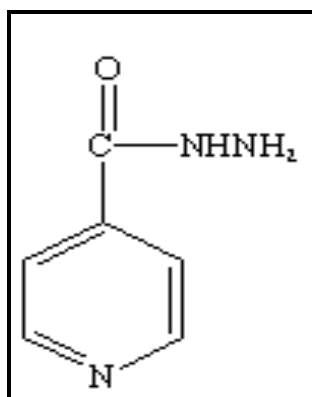


Figure 1 : Isoniazide (C₆H₇N₃O) [21] PM = 137,14

1.1.2. Caractères physico-chimiques

L'isoniazide est une poudre cristalline blanche, inodore, légèrement affectée par exposition à l'air et à la lumière. Elle est soluble dans l'eau et dans l'alcool, légèrement soluble dans le chloroforme, et pratiquement insoluble dans l'éther.

1.1.3. Mécanisme et spectre d'action [37]

L'isoniazide est l'hydrazide de l'acide isonicotinique. C'est un antibiotique majeur, bactéricide pour les mycobactéries intra et extracellulaires, actif par voie orale. L'INH agit sur la paroi du bacille par inhibition de la synthèse des acides mycoliques, modifie l'activité peroxydasique, inhibe la glycolyse et la biosynthèse des acides nucléiques.

Son spectre est limité aux mycobactéries typiques et l'effet bactéricide se manifeste sur les Bacilles de Kock (B.K.) en phase de croissance.

1.2. L'éthambutol (EMB)

1.2.1. Structure

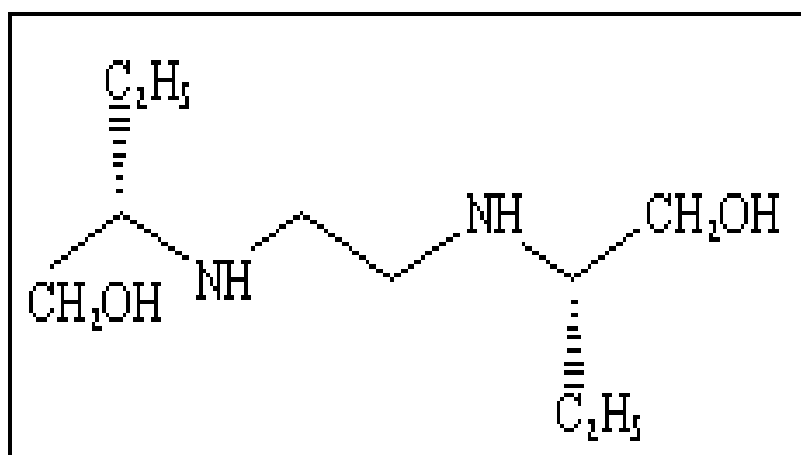


Figure 2 : Ethambutol (C₁₀H₂₄N₂O₂) [21]

PM = 277,2

1.2.2. Caractères physico-chimiques

L'éthambutol est une poudre hygroscopique cristalline blanche, inodore, au goût amer. Elle est soluble dans l'eau, l'alcool, le chloroforme et très légèrement soluble dans l'éther. La poudre doit être conservée dans des récipients hermétiques entre 15° et 30°C.

1.2.3. Mécanisme et spectre d'action [37]

L'éthambutol est le dérivé de l'éthylène diamine. C'est un tuberculostatique efficace sur les BK intra et extracellulaires. Son activité s'explique par l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques bactériens. Il n'existe pas de résistance croisée avec les autres antituberculeux mais il sera associé pour éviter l'apparition de mutants résistants.

1.3. La rifampicine (RMP)

1.3.1. Structure

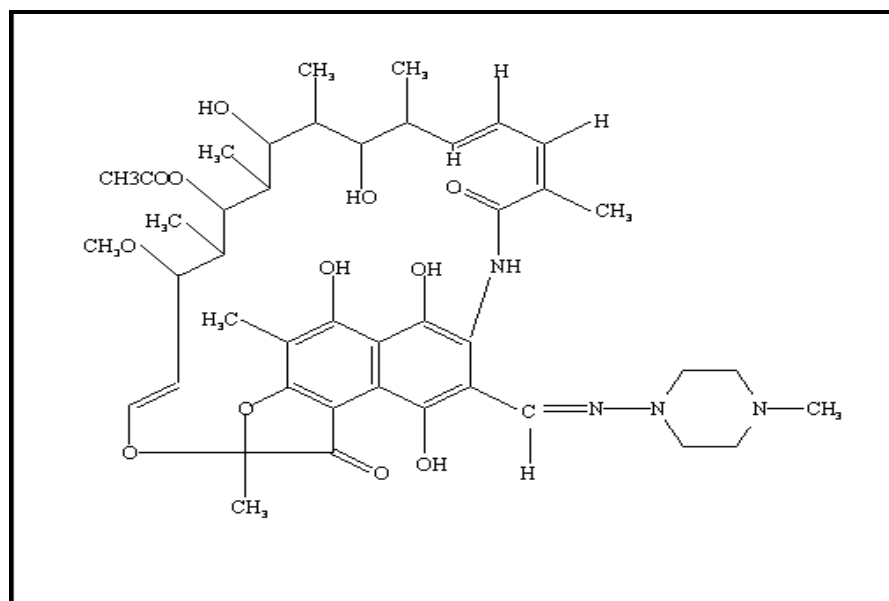


Figure 3 : Rifampicine (C₄₃H₅₈N₄O₁₂) [21]

PM = 822,96

1.3.2. Caractères physico-chimiques

La rifampicine se présente sous forme de poudre de couleur rouge-orangée. Elle est soluble dans le diméthylsulfoxyde, le chloroforme, l'alcool méthylique et très légèrement soluble dans l'eau, l'acétone, l'éther. La conservation se fait à 25°C dans des récipients hermétiques à l'abri de la lumière, de la chaleur et de l'humidité.

1.3.3. Mécanisme et spectre d'absorption

Le mécanisme d'action de la rifampicine s'explique par une inhibition de la synthèse de l'ARN des mycobactéries en bloquant l'ARN polymérase déjà combinée à l'ADN bactérien. Son activité n'est pas limitée aux mycobactéries puisqu'elle s'étend également aux staphylocoques méticillino-résistants et à certaines bactéries à Gram négatif.

1.4. Le pyrazinamide (PZA)

1.4.1. Structure

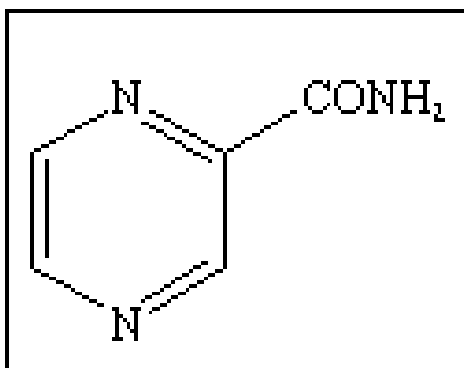


Figure 4 : Pyrazinamide (C₅H₅N₃O) [21]

PM = 123,11

1.4.2. Caractères physico-chimiques

Le pyrazinamide se présente sous forme de poudre blanche cristalline. Elle est soluble dans l'eau et insoluble dans les solvants organiques. La poudre doit être conservée dans des récipients hermétiques entre 15° et 30°C.

1.4.3. Mécanisme et spectre d'action

Le pyrazinamide est un analogue pipéraziné du nicotinamide particulièrement efficace à un pH acide sur les mycobactéries. Son utilisation est intéressante vis-à-vis des mycobactéries résistantes à l'isoniazide.

1.5. La streptomycine (SM)

1.5.1. - Structure

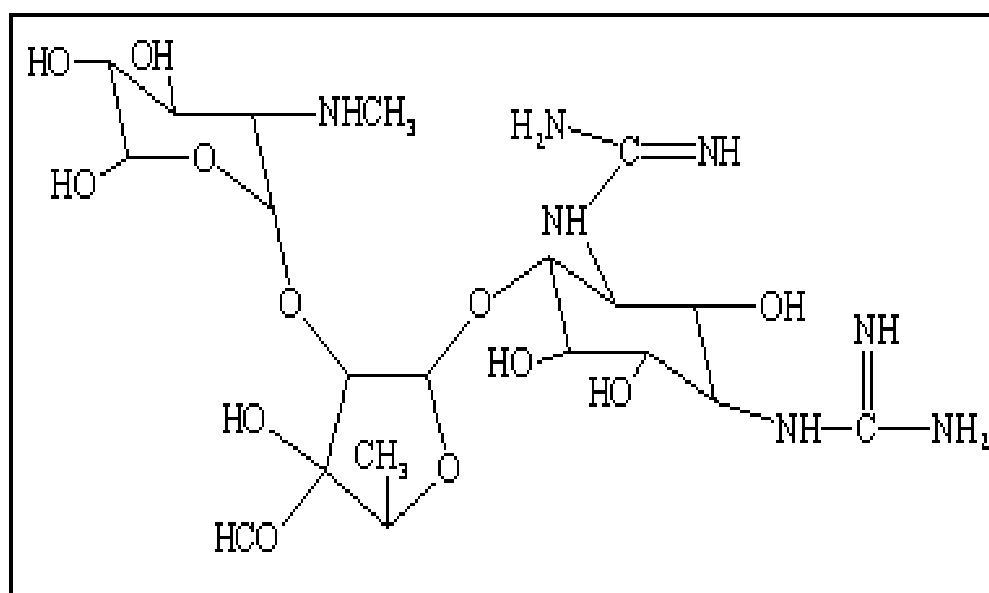


Figure 5 : Streptomycine (C₁₉H₃₇N₇O₁₂) [21]

PM = 555,41

1.5.2. Caractères physico-chimiques

La streptomycine est une poudre grisâtre, inodore et au goût légèrement amer. Les formes sels sont hygroscopiques mais ne sont pas affectées par exposition à l'air et à la lumière. La streptomycine a une grande activité en pH alcalin. Elle est soluble dans l'eau, et pratiquement insoluble dans les solvants organiques.

1.5.3. Mécanisme et spectre d'action

La streptomycine agit par fixation sur la sous-unité 30S du ribosome bactérien conduisant à la formation d'un « peptide-non-sens » létal pour certaines mycobactéries.

2. LES ANTITUBERCULEUX DE « SECONDE INTENTION »

2.1. La Ciprofloxacine

2.1.1. Structure

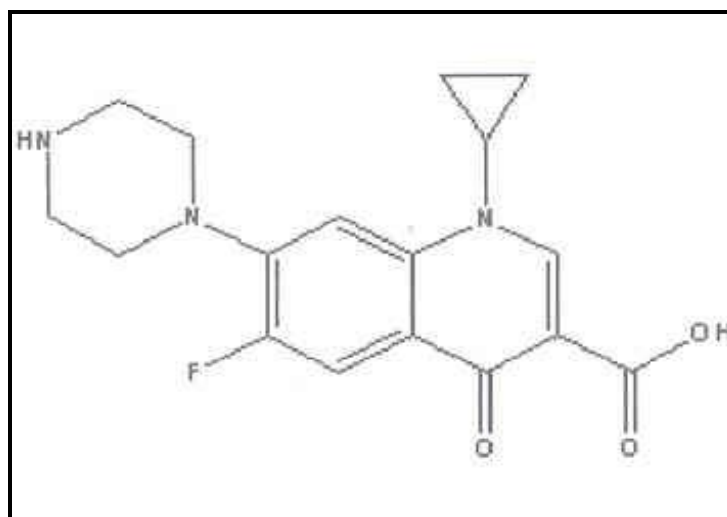


Figure 6 : Ciprofloxacine (C₁₇H₁₈FN₃O₃) [21]

PM = 331,3

2.1.2. Caractères physico-chimiques

La ciprofloxacine est une poudre cristalline blanche, inodore. Elle est soluble dans l'eau et dans l'alcool, légèrement soluble dans le chloroforme et pratiquement insoluble dans l'éther. La conservation se fait à 25°C dans des récipients hermétiques à l'abri de la lumière, de la chaleur et de l'humidité.

2.1.3. Mécanisme et spectre d'action

La ciprofloxacine agit par inhibition de la sous unité A de l'ADN gyrase et bloque ainsi le processus d'enroulement nécessaire à la réplication de l'ADN bactérien.

CHAPITRE II : METHODES DE DOSAGE ET DE CONTROLE DES ANTIBIOTIQUES

1. DOSAGES MICROBIOLOGIQUES [4] [10]

Les méthodes de dosage microbiologique permettent d'analyser le spectre d'activité antibactérienne d'une substance, mais également de quantifier cet antibiotique.

L'activité d'un antibiotique est estimée par comparaison de l'inhibition de la croissance de microorganismes sensibles provoquée respectivement par des concentrations connues de l'antibiotique à examiner et d'une substance de référence. Les préparations de référence utilisées dans les titrages sont des substances dont l'activité a été déterminée avec précision par rapport à l'étalon international correspondant ou à la préparation de référence internationale.

Le plan expérimental doit être tel qu'il permette de vérifier la validité du modèle mathématique sur lequel est basée l'équation de l'activité. Si un modèle de lignes parallèles est choisi, les 2 relations log dose - réponse correspondant à la préparation à examiner et à la préparation de référence doivent être parallèles ; elles doivent être linéaires dans l'intervalle des doses retenues pour le calcul du titre.

Les deux principales méthodes utilisées pour le dosage microbiologique des antibiotiques sont :

- la méthode par diffusion
- la méthode turbidimétrique

1.1. Diffusion sur gélose [10] [16]

Un milieu gélosé estensemencé avec une souche bactérienne test choisi pour sa grande sensibilité à l'antibiotique à doser. La méthode des disques consiste à déposer des volumes identiques représentant plusieurs dilutions de l'antibiotique sur des

rondelles de papier absorbant de bonne qualité et stériles. Ces disques sont mis au contact d'une surface gélosée contenant 10^6 à 10^7 cellules souches indicatrices.

Pendant l'incubation, l'antibiotique diffuse dans la gélose de façon radiaire à partir de son point d'application. Après 15 à 48 heures à la température optimale de croissance du micro-organisme, les diamètres d'inhibition qui apparaissent sous l'aspect de zones claires sont mesurés.

Après incubation, les diamètres de zones d'inhibition correspondant aux concentrations de la gamme étalon sont mesurés. La droite reliant le logarithme de chaque concentration au diamètre correspondant est établie sur papier semi-logarithmique. Le diamètre d'inhibition de chaque échantillon est reporté sur la droite, ce qui permet de déduire la concentration d'antibiotique correspondante.

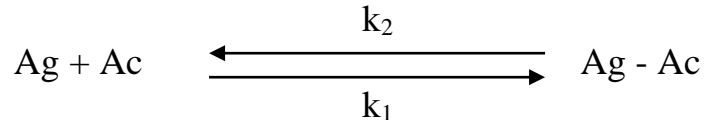
1.2. Turbidimétrie

Elle consiste à incuber des tubes calibrés contenant à la fois le milieu de culture inoculé avec une bactérie sensible et les solutions de l'antibiotique à doser (ou de la solution standard).

Après la période d'incubation, l'effet de l'antibiotique sur la croissance bactérienne est mesuré par le changement de turbidité de la culture. L'absorbance est mesurée à 530 nm. Les valeurs obtenues avec des solutions standards permettent d'établir l'équation entre l'absorbance et la concentration en antibiotique.

2. DOSAGES IMMUNOLOGIQUES [4] [10]

Les dosages immunologiques reposent sur la mise en œuvre d'une ou de plusieurs réactions d'équilibre entre un antigène (Ag) et un anticorps (Ac) conduisant à un complexe antigène-anticorps. La liaison Ag-Ac est une liaison sélective, réversible et non covalente.



La réaction d'équilibre obéit à la loi d'action de masse et est définie pour une température donnée par une constante K.

$$K = k_1 / k_2$$

K_1 et k_2 représentent respectivement la constante de formation et de dissociation du complexe antigène – anticorps. K peut être exprimé par la formule suivante :

$$K = \frac{|\text{Ag} - \text{Ac}|}{|\text{Ag}| \times |\text{Ac}|}$$

Parmi ces méthodes, nous avons les méthodes d'immunofluorescence et immunoenzymatiques dont l'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) et l'EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique).

3. CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES

Elles font intervenir des phases préliminaires pour déterminer la stabilité, la solubilité et le caractère ionique du produit à doser. Ensuite, nous avons l'extraction du principe actif par des solvants organiques qui utilise :

- *la purification par chromatographie :*

- la chromatographie d'absorption
- la gel filtration : la phase stationnaire est un liquide et la phase solide est un gel.

● ***la chromatographie analytique :***

- la chromatographie sur couche mince (CCM) est un procédé de séparation dans lequel la phase stationnaire est un matériau adéquat, étalé en une couche mince uniforme, fixée sur un support de verre, de métal ou de plastique. La séparation s'effectue par migration de solutés dans un solvant sur la couche mince ;
- la chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode de séparation dans laquelle la phase mobile est un gaz vecteur et la phase stationnaire contenue dans la colonne est constituée par un solide ou un liquide réparti sur un support solide inerte ou par un film liquide recouvrant uniformément les parois de la colonne. Elle est fondée sur des phénomènes d'adsorption et/ou de partage ;
- la chromatographie liquide haute performance (HPLC) est la plus utilisée pour le dosage des antibiotiques dans les milieux biologiques. Elle utilise des propriétés physico-chimiques propres d'un composé contenu dans une technique pour obtenir sa séparation. La phase mobile est un liquide et la phase stationnaire des granulations fines ou un solide imprégné de liquide.

● ***la spectrométrie :***

La spectrométrie est une méthode destructive, qui permet à la fois d'accéder à la mesure de la masse moléculaire d'une substance ainsi que d'obtenir des données structurales.

Remarque : *la qualité et l'efficacité de ces méthodes de dosage peuvent être validées par certains paramètres.*

CHAPITRE III : QUALITE DES MEDICAMENTS

[21] [25] [26] [30] [39] [40]

Le médicament est destiné à protéger la santé d'un individu et d'une collectivité : ce n'est donc pas un produit banal. De ce fait, le médicament doit faire l'objet d'un contrôle tant sur le plan scientifique que médico-social. Il y a de nombreuses façons d'évaluer la qualité des médicaments.

Des normes de qualité reconnues sont publiées périodiquement sous forme de pharmacopées qui fournissent des descriptions détaillées des caractéristiques du médicament et des techniques analytiques.

Parmi les pharmacopées connues figurent la pharmacopée internationale publiée par l'O.M.S., la pharmacopée européenne, la pharmacopée américaine (U.S.P.).

L'association des fabricants de produits pharmaceutiques américains définit la qualité comme un concept applicable aux produits pharmaceutiques et étant la somme de tous les facteurs qui contribuent directement ou indirectement à la sécurité, à l'activité et à l'acceptabilité du produit.

Selon la définition publiée par l'A.P.H.A. (American Pharmaceutical Association) et qui a le mérite de préciser ce qu'est la bonne qualité pour l'utilisateur, la désignation « qualité » appliquée à un médicament exige que ce dernier :

- contienne la quantité de chaque principe actif inscrite sur l'étiquette dans les limites applicables de ses spécifications ;
- contienne cette quantité dans chaque dose unitaire ;
- soit exempt de substances étrangères ;
- maintienne son dosage, sa disponibilité thérapeutique et son apparence jusqu'à utilisation ;

- libère le principe actif avec une entière bio-disponibilité après administration.

La caractéristique commune de ces deux définitions de la qualité du médicament est l'accent mis sur la satisfaction et la sécurité.

1. LES CRITERES DE QUALITE

Les caractéristiques les plus importantes d'un médicament sont l'identité, la pureté, l'uniformité, la bio-disponibilité, l'innocuité, la stabilité et le conditionnement.

1.1. L'identité

Le principe actif doit être présent dans le produit.

1.2. La pureté

La plupart des médicaments contiennent des principes actifs et adjuvants qui sont ajoutés pour la consistance, la couleur, etc. Il est important que ces adjuvants ne contiennent pas de contaminants potentiels nocifs.

1.3. L'innocuité

Le médicament pris dans les conditions normales est inoffensif.

1.4. L'activité

Le médicament doit être efficace contre l'affection pour laquelle elle est utilisée.

1.5. L'acceptabilité

Le médicament ne doit pas être rejeté par l'organisme.

1.6. L'uniformité

La consistance, la couleur, la forme, la taille des comprimés et des gélules ne doivent pas varier d'un échantillon à l'autre pour un même médicament.

1.7. La biodisponibilité

Il arrive qu'un médicament paraisse excellent et passe tous les tests analytiques mais, une fois donné au malade il n'est pas absorbé correctement dans la circulation sanguine et n'a pas de ce fait l'effet thérapeutique attendu. La biodisponibilité est la vitesse et l'intensité de mise à disposition du principe actif (ou de sa fraction thérapeutique destinée à devenir disponible) au niveau des sites d'action.

1.8. La stabilité

Elle peut être définie comme l'aptitude d'un médicament à conserver ses propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et bio-pharmaceutiques dans les limites spécifiées pendant toute sa durée de validité.

1.9. La conservation ou conditionnement

C'est l'opération complémentaire de la mise en forme. Il a pour objectifs :

- de contenir la forme pharmaceutique et de la protéger des chocs et des déformations ;
- de faciliter la distribution du médicament et son utilisation par le malade ;
- d'être un élément de sécurité et doit porter en particulier une étiquette appropriée ;
- d'être en harmonie avec le caractère noble du médicament et de ce fait inspirer confiance au malade.

CHAPITRE IV : PROCEDURES ET DEFINITIONS DE QUELQUES PARAMETRES DE VALIDATION

[5] [9] [18] [20] [24] [46] [56]

La définition des critères de qualité destinés à valider une technique de dosage a fait l'objet du travail d'un groupe d'experts.

Sur la base des données expérimentales provenant de l'application du protocole de validation de techniques et de l'exploitation des résultats de différents programmes de contrôle de qualité intra et inter-laboratoires, des limites acceptables sont proposées.

Ces limites sont destinées à juger de la qualité d'une technique de dosage et à la valider en fonction de sa reproductibilité et de sa justesse.

Pour chaque analyse, sont rapportés le domaine de mesure, les valeurs applicables à titre indicatif, les trois niveaux de concentration des préparations de contrôle à utiliser pour l'évaluation ainsi que l'intervalle des valeurs dans lequel elles peuvent être choisies et les limites de répétabilité et de reproductibilité exprimées en termes de coefficient de variation (en pourcentage).

Le respect des règles d'assurance qualité des laboratoires oblige à la validation des techniques au préalable et à le justifier. Il s'agit d'un pré-requis indispensable dans le cadre de l'accréditation des laboratoires. Cette opération s'effectue en deux étapes : l'évaluation des performances de la technique suivie de leur validation pour vérifier leur conformité à des normes. Ces exigences sont réglementaires, mais le référentiel permettant de définir les qualités souhaitables d'une technique d'analyse n'existe pas.

Le guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale indique que c'est aux biologistes qu'incombe le choix des méthodes optimisées utilisées dans un grand

nombre de laboratoires et recommandées par les sociétés scientifiques nationales ou internationales de biologie ou dans le cas échéant validées par lui-même à condition qu'elles permettent, dans la mesure du possible, le transfert des résultats et que des procédures opératoires doivent être techniquement validées afin d'assurer la qualité des résultats.

La validation a donc pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique déterminée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faudra donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel il sera employé. En effet la validation inclut la spécification des exigences, la détermination des caractéristiques des méthodes, la comparaison des exigences aux valeurs caractéristiques de la méthode, ainsi qu'une déclaration relative à la validité.

Ainsi la validation d'une méthode permet de connaître ses caractéristiques pour définir et juger la qualité du processus analytique ; et d'en préciser les limites de validité.

La validation peut se décomposer en différents modules correspondant à l'évaluation de chacune de ses caractéristiques :

- linéarité du domaine d'utilisation ;
- limites de détection ;
- précision ;
- répétabilité et reproductibilité ;
- spécificité ;
- sensibilité ;
- exactitude.

1. LINEARITE OU DOMAINE D'ANALYSE

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à donner des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans les échantillons.

Ces caractéristiques sont déterminées en appliquant la méthode à une série d'échantillons dont les concentrations en analyte couvrent tout le domaine d'utilisation proposé. Il faut analyser chaque dilution en triple, puis répéter l'essai.

2 LIMITE DE DETECTION

C'est la plus petite quantité ou concentration qui peut être distinguée, avec une probabilité connue, d'un blanc de la réaction réalisé dans les mêmes conditions. Elle est égale à k fois l'écart type de précision, mesuré sur le blanc.

$$LD = S \times k$$

LD = limite de détection

S = écart-type

k = facteur dépendant du nombre de mesures effectuées

3. PRECISION

C'est le degré d'accord entre les résultats obtenus lors d'essais différents. Elle est mesurée par la dispersion des résultats individuels de part et d'autre de la moyenne et elle est généralement représentée par l'écart type ou par le coefficient de variation calculé après avoir appliqué la méthode complète de façon répétée à un certain nombre d'échantillons identiques sur le même lot homogène du produit à analyser.

4. REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE

C'est une évaluation de la dispersion des résultats obtenus à partir des aliquotes d'un même spécimen distribués dans une même série d'analyse (répétabilité), ou dans des séries différentes (reproductibilité).

4.1. Répétabilité

La mesure de la variation des résultats obtenus au sein d'un même laboratoire caractérise la précision obtenue lorsque la méthode est répétée par le même analyste dans les mêmes conditions (réactifs, matériel, réglage, laboratoire) dans un court intervalle de temps.

Pour définir la répétabilité, il faut déjà définir la fidélité qui est l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'essais. La répétabilité est la fidélité sous des conditions de répétabilité, c'est-à-dire des conditions où des résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques, dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps. Il faut calculer les variances de chaque série de mesure, puis la variance intra-série (V) et l'écart type (S) en utilisant les formules suivantes :

$$V = \frac{V_1 (n_1 - 1) + V_2 (n_2 - 1) + \dots}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots}$$

$$S = \sqrt{V}$$

4.2. Reproductibilité

C'est la précision de la méthode lorsqu'elle est appliquée dans des conditions différentes, généralement dans les laboratoires différents, à des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser.

La comparaison des résultats par différents analystes, avec un matériel différent, à des dates différentes, peut aussi fournir des informations précises à cet égard. Il suffit de calculer la moyenne et l'écart type des valeurs obtenues pour un même spécimen au cours des séries indépendamment effectuées en exploitant les formules suivantes :

$$m = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m)^2}{n - 1}}$$

x_i = chaque valeur

n = nombre total de valeurs

S = écart-type

m = moyenne

5. SPECIFICITE

La spécificité est la propriété d'une méthode d'analyse de convenir exclusivement à l'analyte, avec la garantie que le résultat de l'analyse ne provient que de l'analyse. La sélectivité (ou l'absence de la sélectivité), peut s'exprimer par l'erreur systématique constatée dans les résultats obtenus avec l'analyte en présence des concentrations escomptées des autres constituants, par comparaison des résultats obtenus en l'absence de ces substances.

6. SENSIBILITE

C'est l'aptitude de la méthode à détecter de petites variations de concentration. Elle est représentée par la pente de la courbe d'étalonnage. On doit éviter de donner à ce terme un sens plus général englobant la limite de détection et/ou de dosage.

7. EXACTITUDE OU JUSTESSE

C'est l'évaluation de l'exactitude d'une méthode B par rapport à une méthode A reconnue pour sa fiabilité (technique de référence), avec des spécimens de contrôle.

L'exactitude d'une méthode est le degré de concordance entre les résultats obtenus et la vraie valeur de la grandeur mesurée.

DEUXIEME PARTIE

TRAVAIL PERSONNEL

CHAPITRE I : CADRE D'ETUDE

Notre étude a été réalisée au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (LNCM). Ce laboratoire comprend trois unités qui permettent d'assurer le contrôle de qualité des différentes formes pharmaceutiques disponibles sur le marché sénégalais :

- le bureau Physico-chimie et Pharmaco-technie ;
- le bureau Microbiologie ;
- le bureau Vaccin pour le contrôle exclusif du vaccin de la fièvre jaune fabriqué par l'Institut Pasteur de DAKAR.

Outre ces trois unités, il y a :

- le bureau Assurance-qualité ;
- le bureau Toxicologie-Pharmacologie ;
- le bureau de gestion.

La mission du laboratoire est le contrôle technique des médicaments en relation avec la Direction de la Pharmacie et des Laboratoires. Il est dirigé par un pharmacien chef qui est aidé dans sa tâche par d'autres pharmaciens.

Nous avons eu à travailler essentiellement dans les locaux de la microbiologie. Ce bureau est chargé du contrôle de stérilité et de pureté microbienne mais aussi du dosage de l'activité antibiotique.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

1. MATERIELS

1.1. Appareillage et verrerie

❖ Appareillage

- Agitateur type Vortex
- Autoclave stérilisant
- Balance de précision
- Chronomètre
- Congélateur
- Etuve
- Hotte à flux laminaire
- Microscope optique
- pH-mètre

❖ Verrerie

- Anses
- Becher
- Boîtes de pétri
- Disques
- Ecouvillons
- Eprovettes
- Flacons de 60 ml, 100 ml, 500 ml
- Pipettes de 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml
- Pincés
- Pissette
- Portoir
- Tubes à essais

1.2. Réactifs et milieux de culture

1.2.1. Etalons de référence

- Isoniazide référence standard (RS)
- Rifampicine RS
- Streptomycine RS
- Ciprofloxacine RS

1.2.2. Solvants

- Eau physiologique
- Eau distillée
- Diméthylsulfoxyde (DMSO)
- Peroxyde d'hydrogène
- Solutions tampons

■ Préparation des solutions tampons

● Tampon₃ pH 8

Phosphate monopotassique	0,0524 g
Phosphate dipotassique	1,673 g

● Tampon₃ pH 7

Phosphate monopotassique	0,5 g
Phosphate dipotassique	1,1 g

Pour chaque tampon, nous avons dissous les différentes quantités pesées dans 100 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté selon les besoins avec HCl 0,1N ou NaOH 0,1N.

1.2.3. Milieux de culture

Les milieux de culture sont adaptés à chaque antibiotique. Ces milieux se définissent comme des supports nutritifs stériles, permettant aux bactéries qui sont à leur contact d'y trouver les éléments nécessaires à leur croissance.

■ Antibiotic Medium 11 (AM₁₁)

• Composition

Extrait de viande de bœuf	1,5 g
Extrait de levure	3 g
Agar	1,5 g
Eau	1000 ml
pH	8,3

• Préparation

2,55 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée.

■ Antibiotic Medium 2 (AM₂)

• Composition

Extrait de viande de bœuf	1,5 g
Extrait de levure	6 g
Agar	1,5 g
Eau	1000 ml
pH	6,6

• Préparation

2,55 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée.

N.B. : la stérilisation des différents milieux préparés a été faite à 121°C pendant 15 minutes.

Le milieu, une fois préparé, a été conservé à 4°C ce qui a permis d'avoir une bonne stabilité durant toute la période de conservation.

1.2.4. Souches de référence

L'utilisation des souches de référence permet de vérifier la conformité des résultats tests. Dans le but de s'assurer de leur pureté et d'éviter toute contamination, ces souches de référence ont été validées par une identification basée sur les caractères morphologiques et biochimiques.

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

1.2.5. Antituberculeux utilisés

L'étude a porté sur les médicaments antituberculeux les plus fréquemment utilisés dans le cadre du programme de lutte contre la tuberculose.

Tableau III : Antituberculeux testés

	DCI	Formes	Doses
Pyrimidiques	Isoniazide	Comprimés	100mg
Aminosides	Streptomycine	Poudre injectable	1g
Rifamycines	Rifampicine	Comprimés	150 mg
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	Comprimés	500 mg

2. TESTS PREALABLES DE STERILITE ET D'EFFICACITE

2.1. Tests de stérilité

2.1.1. Milieux de culture

Les milieux de culture ont été préparés aseptiquement, stérilisés puis coulés dans des boîtes de pétri stériles.

La stérilité des milieux a été testée en incubant un échantillon à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Si aucune pousse n'est observée, le milieu est considérée comme stérile et est conservée à + 4°C.

2.1.2. - Tampons

Nous avons travaillé avec des milieux de culture dont la stérilité a été vérifiée. Sur ces milieux coulés en boîtes de Pétri, nous avons ensemencé les tampons stérilisés en stries puis incubé à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

2.2. - Tests d'efficacité

Il s'agit de tests préliminaires effectués avec les milieux de culture et tampons stériles ainsi qu'avec les substances de référence. Le milieu de culture a été régénéré et laissé en surfusion entre 45 et 50°C puis coulé en boîtes de pétri. Après séchage, nous avons ensemencé la suspension bactérienne par écouvillonnage, déposé les disques avec une pince stérile.

Ces disques sont chargés avec 15 µl de chaque dilution de la substance de référence. L'incubation a été faite à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

3. METHODES DE DIFFUSION SUR GELOSE

3.1. Principe

Ce dosage consiste à comparer le diamètre d'inhibition de la croissance des micro-organismes sensibles provoquée respectivement par des concentrations connues de l'antibactérien et d'une substance de référence.

3.2. Mode opératoire

3.2.1. Préparation de la suspension bactérienne

L'inoculum est préparé en réalisant une suspension d'une ou de deux colonies bien isolées, obtenues à partir d'une culture jeune.

La suspension de germe est préparée extemporanément à l'aide d'eau physiologique de manière à obtenir une suspension d'opacité équivalente à l'échelle 0,5 Mac Farland (10^8 bactéries/ml).

3.2.2. Préparation de la gamme de dilution

Le principe repose sur la préparation d'une solution mère à l'aide d'un solvant approprié, suivi de dilutions dans le diluant adéquat afin d'obtenir les solutions de travail. La dilution dépend de la concentration supérieure et de la concentration inférieure, par conséquent de l'antibiotique. Les masses à peser dépendent de l'activité potentielle de ces antibiotiques dans les échantillons disponibles.

La formule que nous avons utilisée pour préparation les solutions d'antibiotiques est la suivante :

$$M = \frac{C \times V}{As}$$

M = masse d'antibiotique à peser (mg)

C = concentration de la solution mère ($\mu\text{g/ml}$)

V = volume à préparer (ml)

As = activité spécifique ($\mu\text{g/mg}$)

3.2.3. Ensemencement du milieu

Le milieu de culture est régénéré et mis en surfusion entre 45 et 50°C. Il est ensuite coulé en boîtes de pétri.

Après séchage, l'ensemencement est réalisé à l'aide d'un écouvillon stérile imbibé de la suspension bactérienne pré-calibrée. Au préalable, l'excès de liquide est enlevé en essorant doucement l'écouvillon sur la paroi. L'écouvillon est ensuite passé sur toute la gélose par rotation de 90° pour assurer une bonne distribution de l'inoculum.

Les boîtes sont déposées sur la paillasse pendant 10 minutes de telle sorte que la surface de la gélose soit complètement sèche lors de l'application des disques.

3.2.4. Application des disques

Les disques d'antibiotiques, chargés avec 15 μl de chaque dilution de la substance de référence et de l'antibactérien à doser, sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince en appuyant légèrement.

Les solutions d'antibiotiques et celles de la substance de référence sont disposées de façon alternée afin d'éviter toute interaction entre les solutions les plus concentrées.

Une période de pré-diffusion de 2 heures à la température ambiante est nécessaire afin de réduire les effets dus au décalage de temps entre l'application des solutions sur les disques et ainsi améliorer la pente de régression.

L'incubation se fait à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

Remarques

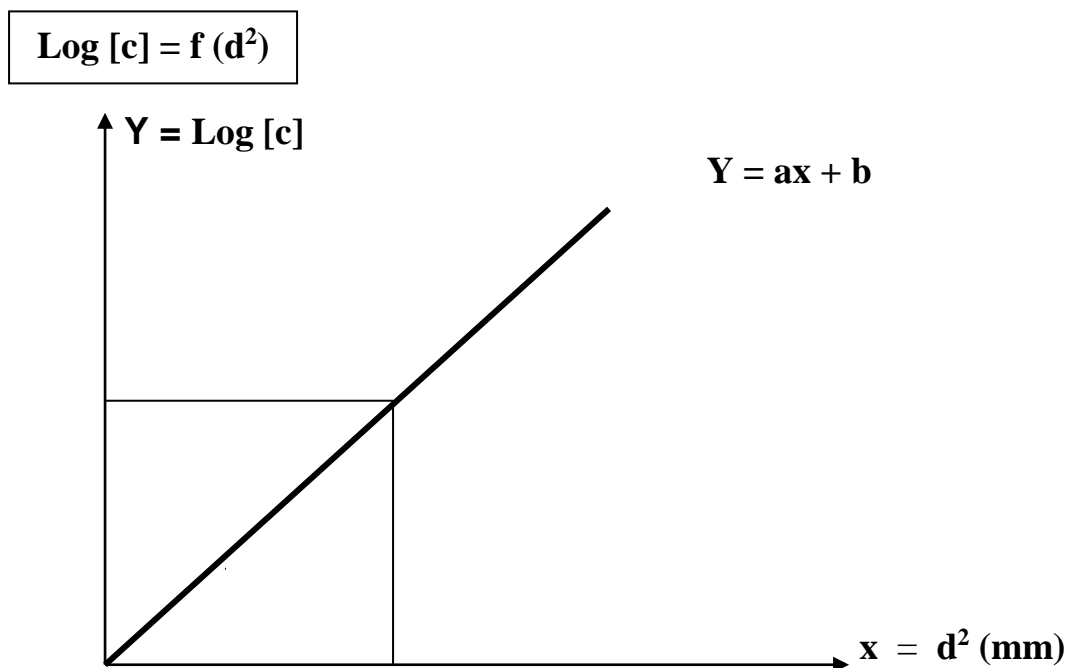
■ Afin de vérifier la validité du titrage, nous avons utilisé 5 concentrations différentes de la substance de référence ainsi que 5 doses de l'antibiotique à titrer ayant la même activité présumée que les doses de la substance de référence.

■ Chaque dose dans chaque titrage a été répétée 3 fois pour assurer la précision requise et vérifier que l'activité de l'antibiotique n'est pas inférieure à l'activité minimale requise.

3.2.5. Expression des résultats

• *Traçage de la droite de régression*

A l'aide d'une règle à coulisse, nous avons mesuré les diamètres des zones d'inhibition correspondant aux concentrations de la gamme d'étalon. Nous avons ensuite établi sur papier semi-logarithmique la droite logarithme (base 2) de la concentration en fonction du diamètre au carré (d^2).



- **Détermination de l'activité**

$$A \% = \frac{DR \times 100}{DT}$$

$$\text{avec } DR = \frac{D \times DT}{E}$$

E = moyenne des diamètres d'inhibition de la référence

D = moyenne des diamètres d'inhibition de l'échantillon

DR = dose réelle

DT = dose mentionnée sur la forme pharmaceutique

A = activité

3.2.6. Standardisation

L'étude de l'action des antituberculeux n'obéit pas à une loi simple aisément formulable par une équation mathématique. Les phénomènes biologiques qui entrent en jeu dépendent de nombreux paramètres. C'est dire l'importance de la stricte standardisation de la technique pour que seule l'activité antibiotique soit appréciée.

- ***Facteurs liés au milieu gélosé***

La composition chimique du milieu, son pH, interfèrent sur la diffusion et l'activité de l'antibiotique ainsi que sur la croissance de la souche test. Le choix du milieu gélosé est fonction en particulier du pH permettant la meilleure activité de l'antibiotique à doser.

L'épaisseur de la gélose modifie la diffusion de l'antibiotique. Elle doit être de 4 mm et le maintien de cette épaisseur dans toute la boîte de pétri joue un rôle déterminant dans la reproductivité des diamètres des zones d'inhibition.

- ***Facteurs liés à la souche bactérienne test***

La souche bactérienne choisie doit être sensible à l'antibiotique que l'on veut doser ; sa croissance dans le milieu doit être bonne et rapide. La densité de l'inoculum bactérien est un élément important ; elle est ajustée par comparaison avec un étalon d'opacité (échelle de Mc Farland).

- Une phase de pré diffusion des antibactériens peut conduire à l'obtention des zones d'inhibition plus importantes.

- La température et la durée d'incubation doivent être fixes.

La rigoureuse observance des règles régissant l'encadrement des différents facteurs s'avère primordiale pour l'obtention de résultats fiables et comparables.

4. APPLICATIONS

4.1. Tests préliminaires de stérilité et d'efficacité

Les différents tests préliminaires sont effectués comme précédemment décrits sur les milieux de culture et tampons préparés.

4.2. Dosage de la ciprofloxacine

Forme dosée : comprimés 500 mg

4.2.1. Réactifs et milieu de culture

Souche test : *Escherichia coli* ATTC 25922

Solvant : eau distillée stérile

Diluant : eau distillée stérile

Milieu : Antibiotic Medium 2

4.2.2. Mode opératoire

Préparation de la gamme de dilution

- **Etalon**

$$C = 1000 \mu\text{g} / \text{ml}$$

$$T = 1000 \mu\text{g} / \text{ml}$$

$$V = 10 \text{ ml}$$

$$M = 10 \text{ mg}$$

Nous avons dissous 10 mg de poudre de ciprofloxacine référence dans 10 ml de solvant. Après une première dilution au $1/10^{\text{ème}}$ de la solution mère, nous avons réalisé une dilution au $8/25^{\text{ème}}$, suivie de dilutions de $1/2$ en $1/2$ afin d'obtenir la gamme [32 - 16 - 8 - 4 - 2] $\mu\text{g} / \text{ml}$.

- **Antibiotique à doser**

Après dissolution de 10 mg de l'antibiotique dans 10 ml d'eau distillée stérile, nous avons fait plusieurs dilutions pour avoir la même gamme que l'étalon.

4.2.3. Titrage

Le milieu AM₂ est régénéré et laisser en surfusion entre 45 et 50°C. Il est ensuite coulé en boîtes de pétri puis séché. Après ensemencement de la suspension bactérienne, les disques sont déposés à l'aide d'une pince stérile sur la gélose puis chargés avec 15 μl de chaque dilution de la gamme. L'incubation a été faite à 37°C pendant 24 heures après une phase de pré diffusion de 2 heures.

4.2.4. Expression des résultats

- ***Traçage de la droite de concordance***

La droite logarithmique (base 2) de la concentration en fonction du diamètre au carré (d^2) $\log [c] = f (d^2)$ a été établie après avoir mesuré les diamètres des zones d'inhibition correspondant aux concentrations de la gamme de dilution.

4.3. Dosage de la streptomycine

Forme dosée : poudre injectable 1g.

4.3.1. Réactifs et milieu de culture

Souche test : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Solvant : Eau distillée

Diluant : Tampon₃ pH 8

Milieu : Antibiotic Medium 11

4.3.2. Mode opératoire

Préparation de la gamme de dilution.

- **Etalon**

$C = 320.000 \mu\text{g/ml}$

$V = 10 \text{ ml}$

$T = 1000 \mu\text{g/mg}$

Nous avons dissous 3,2 g de streptomycine dans 10 ml d'eau distillée.

- dilution au 1/10^{ème} de la solution mère.

- dilutions de 1/2 en 1/2 pour obtenir la gamme [16.000 – 3000 – 4000 – 2000 – 1000] $\mu\text{g/ml}$.

- **Antibiotique à doser**

Nous avons dissous 3200 mg de l'antibiotique dans 10 ml d'eau distillée puis réalisés différentes dilutions pour obtenir la gamme [16.000 – 3000 – 4000 – 2000 – 1000] µg/ml.

4.3.3. Titrage

Le milieu AM₁₁ est régénéré et laissé en surfusion entre 45 et 50°C. Il est ensuite coulé en boîtes de Pétri. Après ensemencement de suspension de germes, les disques sont déposés puis chargés avec 15 µl de chaque dilution de la gamme.

L'incubation a été faite à 37°C pendant 24 heures après une phase de pré-diffusion de 2 heures.

4.3.4. Expression des résultats

- ***Traçage de la droite de regression***

Nous avons mesuré les diamètres des zones d'inhibition correspondant aux concentrations de la gamme de dilution.

Nous avons établi la droite logarithmique (base 2) de la concentration en fonction du diamètre au carré (d²).

4.4. Dosage de la rifampicine

Forme dosée : comprimés 150 mg.

4.4.1. Réactifs et milieu de culture

Souche test : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Solvant : diméthyl sulfoxyde (DMSO)

Diluant : tampon₃ pH 7

Milieu : Antibiotic Medium₁₁

4.4.2. Mode opératoire

Préparation de la gamme de dilution

- **Etalon**

$$C = 10.000 \mu\text{g} / \text{ml}$$

$$T = 950 \mu\text{g} / \text{mg}$$

$$V = 10 \text{ ml}$$

$$M = 105,26 \text{ mg}$$

Nous avons dissous 105,26 mg de poudre de rifampicine référence dans 10 ml de solvant.

- dilution au $1/10^{\text{ème}}$ de la solution mère ;
- dilutions de $1/2$ en $1/2$ à partir de la solution à $100 \mu\text{g}/\text{ml}$;
- obtention de la gamme : [100 - 50 - 25 – 12,5 – 6,25] $\mu\text{g} / \text{ml}$.

- **Antibiotique à doser**

Après dissolution de 105,26 mg de l'antibiotique dans 10 ml de diméthyl sulfoxyde, nous avons fait des dilutions au $1/10^{\text{ème}}$, puis de $1/2$ en $1/2$ pour avoir la même gamme que l'étalon.

4.4.3. Titration

Le milieu est coulé en boîtes de pétri puis séché.

Après ensemencement de la suspension bactérienne, les disques chargés avec 15 μl de chaque dilution sont déposés délicatement sur la gélose. Une phase de pré-diffusion de 2 heures est nécessaire avant l'incubation à 37°C pendant 24 heures.

4.4.4. Expression des résultats

- ***Traçage de la droite de régression***

La droite logarithmique (base 2) de la concentration en fonction du diamètre au carré (d^2) a été établie après avoir mesuré les diamètres des zones d'inhibition correspondant aux concentrations de la gamme de dilution.

4.5. Dosage de l'isoniazide

Forme dosée : comprimés 100 mg.

4.5.1. Réactifs et milieu de culture

Souche test : *Escherichia coli* ATTC 25922

Solvant : peroxyde d'hydrogène 30 %

Diluant : eau distillée

Milieu : Antibiotic Medium 2

4.5.2. Mode opératoire

Préparation de la gamme de dilution

- **Etalon**

$$C = 166.666 \mu\text{g} / \text{ml}$$

$$T = 990 \mu\text{g} / \text{ml}$$

$$V = 15 \text{ ml}$$

$$M = 2525,25 \text{ mg}$$

Nous avons dissous 2,5 g de poudre dans 15 ml de peroxyde d'hydrogène 30%

- dilution au $1/10^{\text{ème}}$ de la solution mère

- dilutions de $1/2$ en $1/2$ de la solution précédente afin d'obtenir la gamme [16.666,6 – 8333,3 – 4166,7 – 2083,3 – 1041,6] $\mu\text{g} / \text{ml}$.

- **Antibiotique à doser**

Après dissolution de 2,5g de l'antibiotique dans 15 ml de peroxyde d'hydrogène, nous avons fait plusieurs dilutions pour avoir la même gamme que celle de l'étalon [16.666,6 – 8333,3 – 4166,7– 2083,3 – 1041,6] µg / ml.

4.5.3. Titration

Le milieu Antibiotic Medium 2 est coulé en boîtes de pétri puis séché. Après ensemencement de la suspension bactérienne, les disques chargés avec 15 µl de chaque dilution sont déposés délicatement sur la gélose. Une phase de pré-diffusion de 2 heures est nécessaire avant l'incubation à 37°C pendant 24 heures.

4.5.4. Expression des résultats

- ***Traçage de la droite de concordance***

La droite logarithmique (base 2) de la concentration en fonction du diamètre au carré (d^2) a été établie après avoir mesuré les diamètres des zones d'inhibition correspondant aux concentrations de la gamme de dilution.

CHAPITRE III : RESULTATS

1. TESTS PREALABLES

1.1. Test de stérilité

1.1.1. Milieux de culture

Après 24 heures d'incubation à l'étuve 37°C, nous n'avons vu aucun développement de germes ; donc ces milieux sont stériles.

1.1.2. Tampons

Le même constat a été fait après 24 heures d'incubation, les tampons sont stériles.

1.2. Tests d'efficacité

Au bout de 24 heures d'incubation, nous avons constaté que toutes les substances sont actives sur les différents germes utilisés.

2. RESULTATS DES ESSAIS PROPUREMENT DITS

Expression des résultats : traçage de la droite de régression :

$$y = a x_i + b \quad ; \quad y = \log [c] \quad ; \quad x = d^2$$

$$a = \frac{N \sum xy - (\sum x) (\sum y)}{N \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{\sum y}{N} - a \frac{\sum x}{N}$$

$$r = \frac{N \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{N \sum x^2 - (\sum x)^2} \sqrt{N \sum y^2 - (\sum y)^2}}$$

r = coefficient de corrélation

x_i = données observées

a = pente de la droite

b = ordonnée à l'origine

N = nombre de paires (x ; y) utilisées pour tracer la droite de concordance

2.1. Dosage des antituberculeux

2.1.1. Détermination de l'activité de la ciprofloxacine

Tableau IV : Résultats du dosage de la ciprofloxacine

Concentration (µg/ml)		32	16	8	4	2
Diamètre d'inh (-)	Référence	27	23	20	14	10
(mm)	Comprimé	26	22	20	12	10
x_R = d_R²		729	529	400	196	100
x_c = d_c²		676	484	400	144	100
y = log [c]		1,50	1,2	0,9	0,6	0,3
x_c.y		1014	580,8	360	86,4	30
x_c²		456.976	234.256	160.000	20.736	10.000
y²		2,25	1,44	0,81	0,36	0,09
a		0,0019				
b		0,2011				
r		0,9633				
DR		483,928				
A %		96,785 %				

L'ensemble des valeurs expérimentales (représentées par des points sur le graphique : *figure 7*) obtenues lors du dosage de l'activité de la ciprofloxacine ;aussi bien la substance de référence que le médicament , montre une bonne linéarité dans la gamme de concentrations retenues [80 µg/ml - 5µg/ml].

Pour confirmer la linéarité, nous avons effectué une analyse plus poussée en utilisant les moyens classiques de l'analyse statistique des données.

Grâce à la méthode des « moindres carrés », la droite de regression de y en x (c'est-à-dire la droite qui reproduit le mieux les variations de la grandeur à étudier) a pu être tracée.

La valeur de la pente est presque nulle, ce qui permet d'affirmer que l'erreur est faible.

La valeur de r ($r = 0,9633$) justifie pleinement la relation linéaire affine trouvée entre x et y.

Le pourcentage d'activité (96,78 %) montre que la ciprofloxacine agit de manière satisfaisante sur *Escherichia coli*.

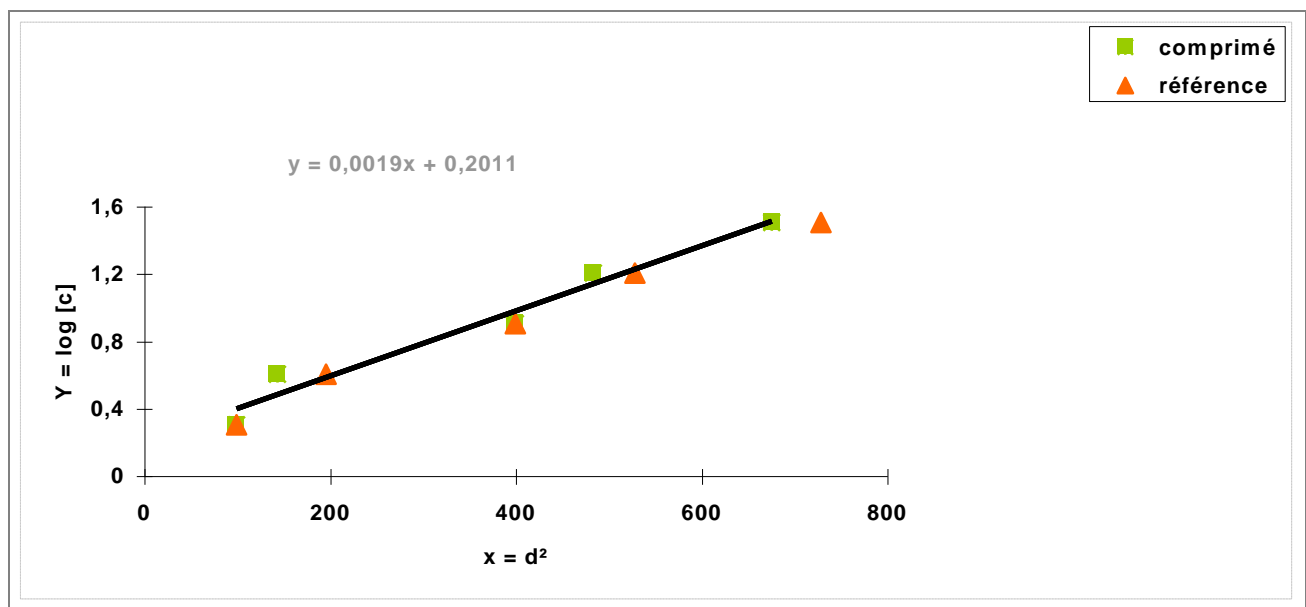


Figure 7: Droite de régression de la ciprofloxacine

2.1.2. Détermination de l'activité de la streptomycine

Tableau V : Résultats du dosage de la streptomycine

Concentration (µg/ml)		16.000	8.000	4.000	2.000	1.000
Diamètre d'inhibition (-) (mm)	Référence	22	20	19	18	16
	Comprimé	21	20	19	18	16
$X_R = d_R^2$		484	400	361	324	256
$x_c = d_c^2$		441	400	361	324	256
$y = \log [c]$		4,2	3,9	3,6	3,3	3
$x_c \cdot y$		1852,2	1560	1299,6	1069,2	768
x_c^2		194.481	160.000	130.000	104.776	65.536
y^2		17,64	15,21	12,96	10,89	9
a		0,0066				
b		1,2404				
r		0,9843				
DR		993,0315				
A %		99,30 %				

Les valeurs des diamètres d'inhibition de la substance de référence sont superposables à ceux du médicament. En effet la forme rectiligne du nuage de point permet d'envisager un ajustement affine.

Le coefficient de corrélation ($r = 0,9843$) est très proche de 1, l'ajustement affine est donc justifié. Les points sont alignés, l'équation de la droite :

$y = 0,0066 x + 1,2404$ permettra de faire des estimations acceptables.

Staphylococcus aureus est très sensible à l'action de la streptomycine (A% = 99,30).

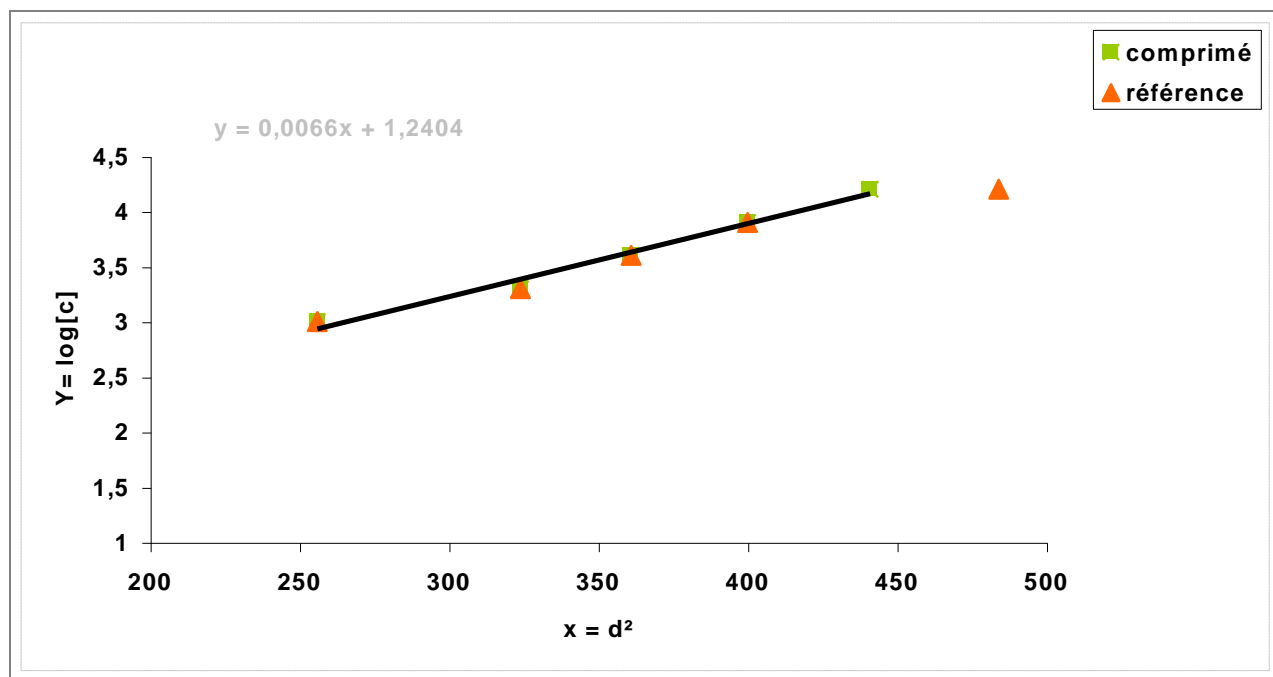


Figure 8: Droite de régression de la streptomycine

2.1.3. Détermination de l'activité de la rifampicine

Tableau VI :Résultats du dosage de la rifampicine

Concentration (µg/ml)		100	50	25	12,5	6,25
Diamètre d'inh (-)	Référence	30	29	27	24	22
(mm)	Comprimé	30	28	26	24	22
$X_R = d_R^2$		900	841	729	576	484
$x_c = d_c^2$		900	784	676	576	484
$y = \log [c]$		2	1,69	1,39	1,09	0,79
$x_c \cdot y$		1.800	1324,96	939,64	627,84	382,36
x_c^2		810.000	614.656	456.976	331.776	234.256
y^2		4	2,856	1,932	1,188	0,624
a		0,0029				
b		- 0,569				
r		0,9979				
DR		147.72				
A %		98.48 %				

La valeur du coefficient de corrélation ($r = 0,997$) met en évidence la qualité de la relation linéaire entre le diamètre de la zone d'inhibition et la concentration de la solution d'antibiotique.

La rifampicine a une bonne activité sur la souche test ($A\% = 98,48$).

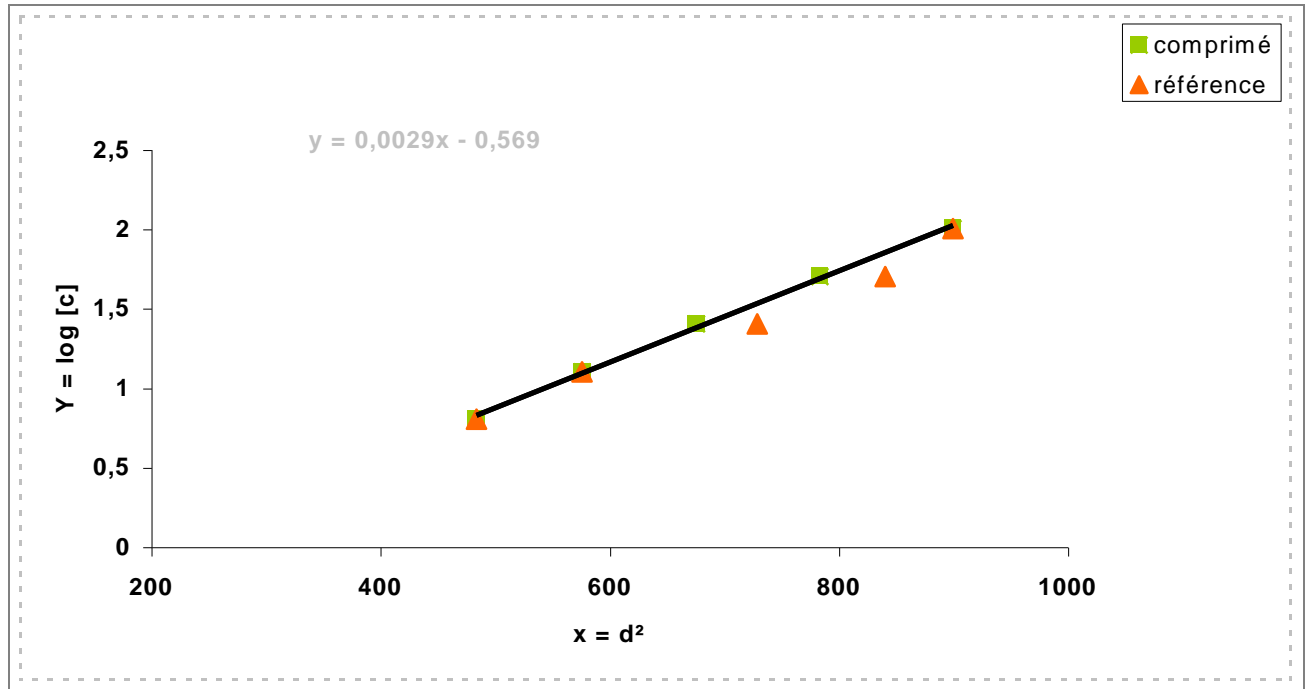


Figure 9 : Droite de régression de la rifampicine

2.1.4. Détermination de l'activité de l'isoniazide

Tableau VII :Résultats du dosage de l'isoniazide

Concentration (µg/ml)		16 666,6	8333,3	4166,6	2063,3	1041,6
Diamètre d'inh(-) (mm)	Référence	41	38	26	21	14
	Comprimé	40	37	26	21	13
$x_R = d_R^2$		1681	1444	676	441	196
$x_c = d_c^2$		1600	1369	676	441	169
$y = \log [c]$		4,2	3,9	3,6	3,3	3
$x_c.y$		6720	5339,1	2433,6	1455,3	507
x_c^2		2560000	1874161	456976	194481	28561
y^2		17,64	15,21	12,96	10,89	9
a		0,0008				
b		2,952				
r		0,962				
DR		98,10				
A %		98,10				

Nous constatons une bonne distribution des données de la référence et de la forme comprimé de l'isoniazide.

Le coefficient de corrélation, situé dans les limites de la valeur standard, traduit la fiabilité de la droite de régression.

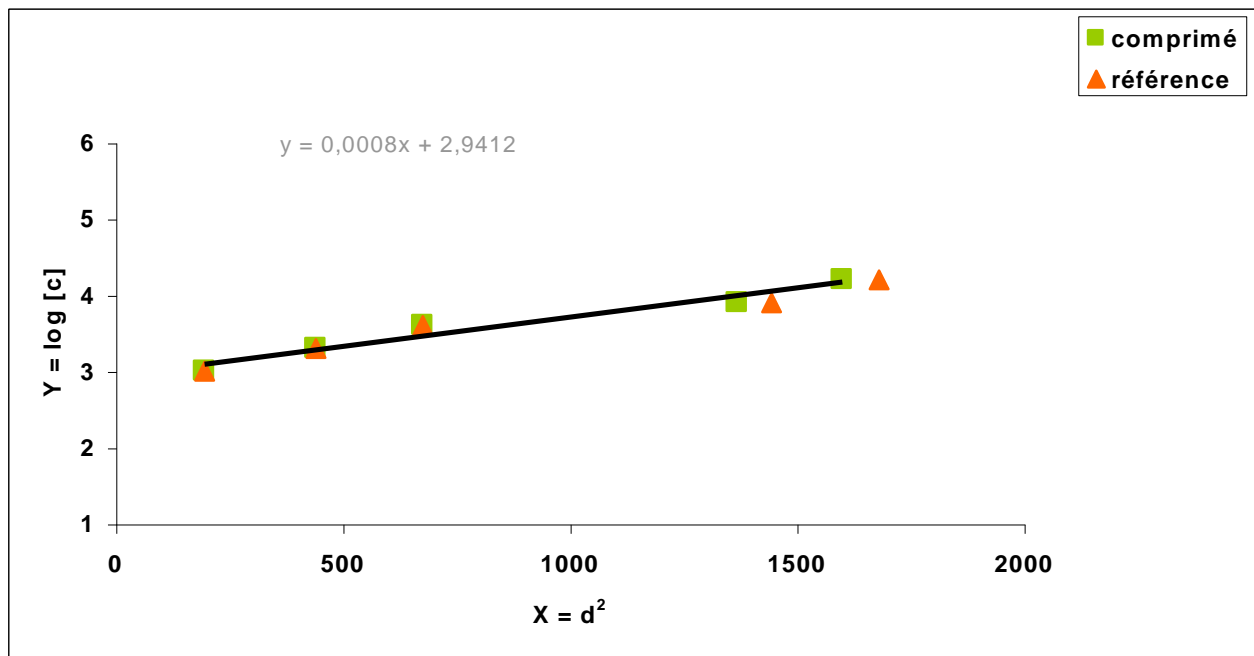


Figure 10 : Droite de régression de l'isoniazide

3. EXPRESSION DES RESULTATS DE LA VALIDATION

Soit Y_{ij} les données dans les groupes d'essais avec n_j répétitions.

- Moyenne m_j des n_j répétitions du groupe j :

$$m_j = \frac{\sum_{i=1}^{n_j} Y_{ij}}{n_j}$$

- Variance S_j^2 des n_j répétitions du groupe j :

$$S_j^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - m_j)^2}{n_j - 1}$$

- L'écart type à l'intérieur du groupe j est donné par :

$$S_j = \sqrt{S_j^2}$$

- Moyenne des moyennes de groupe μ :

$$\mu = \frac{\sum_{j=1}^k m_j}{k}$$

- Variance de répétabilité S_r^2 :

$$S_r^2 = \frac{\sum_{j=1}^k S_j^2}{K}$$

- L'écart type de répétabilité est donné par :

$$S_r = \sqrt{S_r^2}$$

- Variance inter-groupes S_g^2 :

$$S_g^2 = \frac{\sum_{j=1}^k (m_j - \mu)^2}{k-1} - \frac{S_r^2}{n}$$

- Variance de reproductibilité S_R^2 :

$$S_R^2 = S_r^2 + S_g^2 :$$

L'écart type de reproductibilité est donné par $S_R = \sqrt{S_R^2}$

N.B. : Il peut arriver que la valeur calculée de S_g^2 soit négative, on remplace par zéro la valeur négative trouvée.

Habituellement, on exprime les erreurs de répétabilité et de reproductibilité sous forme de coefficient de variation.

$$\text{❖ Répétabilité : } CV_r = \frac{100 S_r}{\mu}$$

$$\text{❖ Reproductibilité : } CV_R = \frac{100 S_R}{\mu}$$

G1 = groupe 1 ;

G2 = groupe 2 ;

G3 = groupe 3.

Tableau VIII : Résultats du calcul des paramètres de validation de la ciprofloxacine

Concentration (µg/ml) Statistiques	32			16			8			4		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
Essai 1	26	25	25	22	23	22	21	20	21	12	12	12
Essai 2	26	25	25	23	23	22	20	21	20	12	13	13
Essai 3	25	25	25	22	23	23	20	20	20	13	13	12
m_j	25,66	25,33	25	22,33	23	22,33	20,33	20,33	20,33	12,33	12,66	12
S_j²	0,333	0,333	0	0,333	0	0,333	0,333	0,333	0,333	0,333	0,333	1
S_j	0,577	0,577	0	0,577	0	0,577	0,577	0,577	0,577	0,577	0,577	0,577
µ	25,33			22,55			20,33			12,55		
S_r²	0,222			0,222			0,333			0,333		
S_r	0,471			0,471			0,577			0,577		
S_g²	0,0349			0,07565			0			0		
S_R²	0,2569			0,2976			0,333			0,333		
S_R	0,505			0,544			0,577			0,577		
CV_r	1,86			2,08			2,83			4,598		
CV_R	2			2,41			2,83			4,598		

La variance répétition à l'intérieur de chaque groupe d'essai est presque nulle.

Les essais de répétabilité et de reproductibilité sont satisfaisants vu les valeurs des coefficients de variation.

Tableau IX : Résultats du calcul des paramètres de validation de la streptomycine

Concentration ($\mu\text{g/ml}$) Statistiques	16.000			8.000			4.000			2.000		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
Essai 1	21	23	21	20	20	20	19	19	19	18	17	17
Essai 2	21	22	22	20	21	20	19	18	19	18	17	16
Essai 3	21	22	22	20	20	20	19	19	18	18	18	17
m_j	21	22,33	21,66	22	20,33	20	19	18,66	18,66	18	17,33	16,66
S_j²	0	0,333	0,333	0	0,333	0	0	0,333	0,333	0	0,333	0,333
S_j	0	0,577	0,577	0	0,577	0	0	0,577	0,577	0	0,577	0,577
μ	21,66			20,77			18,77			17,33		
S_r²	0,222			0,111			0,222			0,222		
S_r	0,471			0,333			0,471			0,471		
S_g²	0,368			0			0			0,374		
S_R²	0,59			0,111			0,222			0,596		
S_R	0,768			0,333			0,471			0,772		
CV_r	2,17			1,60			2,51			2,71		
CV_R	3,54			1,656			2,51			2,71		

La variance de répétition à l'intérieur de chaque groupe des essais 1, 2 et 3 est négligeable.

Les valeurs des coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité ont été jugées satisfaisantes aux différentes concentrations.

Tableau X : Résultats du calcul des paramètres de validation de la rifampicine

Concentration (µg/ml) Statistiques	100			500			25			12,5		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
Essai 1	30	29	30	27	28	28	26	26	26	25	24	25
Essai 2	30	29	30	28	26	29	26	25	26	24	24	25
Essai 3	30	30	29	28	27	27	27	26	26	24	24	24
m_j	30	29,33	29,66	27,66	27	28	26	25,66	26	24,33	24	24,66
S_j²	0	0,333	0,333	0,333	1	1	0	0,333	0	0,333	0	0,333
S_j	0	0,577	0,577	0,577	1	1	0	0,577	0	0,577	0	0,577
µ	29,66			27,55			25,88			24,33		
S_r²	0,222			0,777			0,111			0,222		
S_r	0,471			0,881			0,333			0,471		
S_g²	0,038			0			0,0016			0,0349		
S_R²	0,26			0,777			0,1126			0,2569		
S_R	0,508			0,881			0,334			0,506		
CV_r	1,59			3,19			1,28			1,93		
CV_R	1,72			3,19			1,29			2		

Les variances de répétabilité et de reproductibilité sont négligeables aux différentes concentrations.

Les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité sont tous inférieurs à 15%.

Tableau XI : Résultats du calcul des paramètres de validation de l'isoniazide

Concentration (µg/ml) Statistiques	16666,66			8333,3			4166,65			2083,3		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
Essai 1	40	40	40	36	36	37	26	26	26	20	20	20
Essai 2	40	40	40	37	37	36	26	26	26	21	21	20
Essai 3	41	40	40	37	37	37	26	26	26	21	20	20
m_j	40,33	40	40	36,66	36,66	36,66	26	26	26	20,66	20,33	20
S_j²	0,333	0	0	0,333	0,333	0,333	0	0	0	0,333	0,333	0
S_j	0,577	0	0	0,577	0,577	0,577	0	0	0	0,577	0,577	0
µ	40,111			36,66			26			20,333		
S_r²	0,111			0,333			0			0,222		
S_r	0,333			0,5777			0			0,471		
S_g²	0			0			0			0,0349		
S_R²	0,111			0,333			0			0,256		
S_R	0,333			0,577			0			0,504		
CV_r	0,830			1,57			0			2,31		
CV_R	0,830			1,57			0			2,48		

La variance à l'intérieur des groupes n'est pas significative.

Les essais de répétabilité et de reproductibilité sont satisfaisants vu les valeurs des coefficients de variation.

CHAPITRE IV : DISCUSSION

Toute valeur expérimentale est entachée d'une incertitude de mesure qui limite l'applicabilité de la méthode utilisée. La validation étudie et caractérise les performances et les limites de la méthode d'essai.

1° - Choix de la méthode de dosage

La technique de dosage microbiologique des antituberculeux utilisée dans les différents essais est la diffusion sur gélose. C'est une méthode qui consiste à déposer à la surface de la gélose,ensemencée par la souche bactérienne, des disques de papier-filtre imprégnés de solutions de concentrations connues de l'antibiotique à doser. L'antibiotique diffuse dans la gélose. Après incubation, les diamètres de zones d'inhibition correspondant aux concentrations de la gamme étalon sont mesurés.

En effet, le principe de dosage microbiologique est le même quel que soit l'antibiotique à doser ; seule la méthodologie varie d'une substance à une autre.

Bien qu'elle soit une méthode simple utilisable en routine, il convient cependant d'être rigoureux dans sa mise en œuvre et de respecter un certain nombre de paramètres [7]. Le nombre important de paramètres indépendants entrant dans la détermination de l'activité des antibiotiques par la technique des disques impose une vérification périodique des différentes étapes et de la technique entière. Les fourchettes en millimètres des zones d'inhibition varient en fonction de la souche et de la charge du disque [10].

Les erreurs les plus fréquentes affectant sérieusement les résultats de la méthode interviennent lors des phases suivantes :

- préparation du milieu ;
- standardisation de l'inoculum ;

- temps de pré-incubation ;
- température et atmosphère d'incubation ;
- lecture.

Ces erreurs tiennent aussi à la charge effective du disque appliqué [4] [10].

• **Le milieu de culture**

La composition du milieu doit être strictement conforme aux normes en vigueur.

L'utilisation de milieux commerciaux standardisés permet d'éviter un certain nombre de problèmes notamment celui lié au pH. Nous avons veillé à la bonne conservation de ces milieux ; l'utilisation de milieux périmés a évidemment été proscrite.

L'épaisseur de la gélose est impérativement de 4 millimètres (mm) dans les boîtes de pétri [8] [10]. Ce paramètre a pu être maîtrisé lors des dosages ; en effet, 17 ml ont été coulés dans chaque boîte de pétri, ce qui donne une épaisseur de 4 mm.

Avant utilisation, les boîtes sont séchées 10 à 30 minutes à l'étuve à 37°C pour éliminer l'excès d'humidité et ramener le milieu à la température normale d'incubation. Le choix du milieu gélosé est fonction en particulier du pH qui permet une meilleure activité de l'antibiotique [7][16].

• **La standardisation de l'inoculum**

L'inoculum est réalisé dans de l'eau physiologique à partir d'une culture de 24 heures.

L'inoculum est ajusté avec la gamme étalon de Mac Farland [16]. L'observation de la culture en nappe le lendemain renseigne sur la qualité de cet inoculum.

• **Les souches utilisées**

Nous avons tenu compte de deux critères dans le choix de la souche bactérienne :

- la souche doit être sensible à l'antituberculeux que l'on veut doser ;
- sa croissance dans le milieu gélosé utilisé doit être bonne, rapide, de manière à ce que les diamètres des zones d'inhibition soient visibles et bien délimitées [10].

Vu les spectres d'activité (cf synthèse bibliographique) des antituberculeux testés, vous comprendrez aisément l'utilisation des souches *Staphylococcus aureus* (rifampicine, streptomycine) et *Escherichia coli* (ciprofloxacine, isoniazide).

Des contrôles de pureté ont été effectués lors des différents repiquages pour l'obtention de suspensions bactériennes destinées aux essais. La pureté est vérifiée par isolement (méthode des stries) sur une ou deux boîtes de milieu et par observation microscopique après coloration de Gram pour toutes les souches de référence utilisées. L'identité de la souche est vérifiée selon les méthodes classiques au moyen de galeries d'identification.

• **L'ensemencement**

Différentes méthodes sont utilisées. La technique de flottage (la boîte de gélose est inondée par l'inoculum) impose des contraintes de sécurité. C'est la raison pour laquelle, l'ensemencement par écouvillonnage a été choisi. De plus, elle donne de meilleurs diamètres d'inhibition.

• **Le dépôt des disques**

Une fois les boîtes sèches, les disques sont distribués à l'aide d'une pince stérile (stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 15 minutes).

Les dates de péremption des disques ont évidemment été vérifiées. Les disques utilisés sont des disques non imprégnés donc, il n'y a pas eu de problème lié à la conservation.

● **Les solutions d'antibiotiques**

L'utilisation de solvants et diluants adéquats a permis l'élaboration de la gamme étalon.

Dans le cas de l'isoniazide, nous avons tenu compte de la sensibilité de la souche *Escherichia coli* ATTC 25922 vis-à-vis de cet antituberculeux. L'INH possède une certaine activité sur *Escherichia coli*, activité qu'il a fallu potentialiser en utilisant du peroxyde d'hydrogène comme solvant [58].

● **L'incubation**

Il est important d'observer une pré diffusion des antibiotiques de 2 heures à température ordinaire avant de porter les boîtes à l'étuve pendant 24 heures, couvercle en bas (position renversée) [10].

● **La lecture**

La lecture s'effectue par la mesure des diamètres d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

N.B. : *les appareils utilisés ont été validés par un contrôle technique quotidien.*

■ ***Avantages et inconvénients de la méthode utilisée***

Cette méthode a l'avantage d'une mise en œuvre abordable pour tout laboratoire de microbiologie . Elle n'exige aucun investissement matériel particulier ; permet le dosage d'une grande diversité de familles d'antibiotiques et a une bonne sensibilité.

Elle requiert en contrepartie, du temps et la multiplication des prises d'essai afin d'obtenir une précision satisfaisante.

2° - Choix des molécules

Pour l'essentiel, nous avons testé l'activité d'antituberculeux à sites vrais ; à savoir : les deux antituberculeux bactéricides les plus efficaces (la rifampicine et l'isoniazide), la streptomycine et la ciprofloxacine [2].

La connaissance des propriétés physico-chimiques, des mécanismes d'action et des spectres d'activité ont permis l'utilisation de souches, de solvants et de diluants adéquats [37].

Tout comme l'isoniazide, le pyrazinamide est un dérivé de l'acide nicotinique. Cependant, le dosage de l'activité microbiologique de cet antituberculeux par la méthode de diffusion nécessite la maîtrise d'un nombre important de paramètres [65] :

- la dénaturation du PZA à 94° pendant 10 minutes ;
- l'utilisation d'enzymes ;
- le pH ;
- le temps de réaction ;
- la température de réaction ;
- la densité de l'inoculum.

L'ensemble de ces paramètres a fait porter notre choix sur l'isoniazide pour lequel l'utilisation d'une solution de peroxyde d'hydrogène permet la potentialisation de son activité.

L'éthambutol et le thioacétazone, deux antituberculeux bactériostatiques (beaucoup moins efficaces) nécessite l'utilisation de souches de mycobactéries. En effet, leur activité s'explique par l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques mycobactériens [2] [31].

Cela n'exclut pas pour autant que la détermination de leur activité se fasse par d'autres méthodes telles que la chromatographie liquide haute performance.

3° - Analyse des résultats

• Activité

Une difficulté apparaît lorsqu'on veut comparer les résultats que nous avons obtenus avec ceux d'autres auteurs.

Même si les normes AFNOR font autorité en la matière, il existe de très nombreuses méthodes de détermination de l'activité des antituberculeux [1]. Elles répondent souvent à des objectifs variés, et il n'est pas toujours possible de les comparer les unes aux autres. Les normes AFNOR bien qu'elles soient normalisées et reproductibles, ont un inconvénient de taille : elles n'étudient que le comportement de souches référencées de collection.

Néanmoins, les concentrations comprises dans l'intervalle d'activité fournie par ANHALT J.P. [3] ont permis une meilleure approche de la validation.

Les substances utilisées sont toutes actives sur les germes. Les doses réelles (DR) calculées sont inférieures aux doses mentionnées sur la forme pharmaceutique.

Médicaments	Dose réelle (D.R.)	Dose mentionnée sur la forme pharmaceutique	Activité (A %)
Ciprofloxaciné comprimé	483,928 mg	500 mg	96,78 %
Streptomycine Poudre injectable	993,0315 mg	1g	99,30 %
Rifampicine comprimé	132,297 mg	150 mg	92,19 %
Isoniazide comprimé	98,10 mg	100 mg	98,10 %

La détermination de la valeur de l'activité pour chaque antituberculeux montre que l'antibiotique agit de façon satisfaisante sur le germe utilisé.

● **Paramètres de validation**

Toute méthode d'analyse doit être validée pour démontrer que cette méthode choisie correspond bien à l'usage pour lequel, elle est prévue.

Les paramètres décrits dans le guide de validation des méthodes de dosage biologique élaboré par la commission SFSTP sont : la robustesse, la spécificité, la linéarité, la justesse (exactitude), la fidélité [27].

- La robustesse

Elle donne une indication de la fiabilité de la procédure dans les conditions normales d'application.

La robustesse de la méthode utilisée a été évaluée durant la phase de développement de la procédure analytique. L'étude montre que la technique est sensible à certaines variations de conditions analytiques (réactifs, stabilité des solutions, équipements, conditions environnementales,...) qui ont cependant pu être maîtrisées et contrôlées lors des dosages.

- La spécificité

Le dosage des antibiotiques par méthode microbiologique étant par définition non spécifique (le microorganisme test peut être inhibé par d'autres molécules que l'antibiotique à doser) ; cette caractéristique n'est pas étudiée. Notons que l'absence de spécificité n'est pas nécessairement rédhibitoire pour la validation de la méthode.

- L'exactitude

La justesse est l'écart systématique d'une valeur obtenue par rapport à une valeur considérée comme exacte. C'est le paramètre le plus difficile à déterminer. Les raisons à cela sont, par exemple, le manque de connaissances sur la forme physico-chimique ou sur la pureté et la stabilité d'un matériau de référence.

Les résultats de l'étude de la linéarité ont été exploités pour évaluer l'exactitude.

- La linéarité

Pour évaluer la linéarité de la technique, cinq concentrations régulièrement espacées ont été testées ; avec trois déterminations indépendantes par concentration de manière à obtenir une estimation pertinente de la variabilité et une puissance satisfaisante des tests statistiques.

La linéarité est démontrée et représentée pour chaque dosage (*Annexe 6*).

La valeur des pentes (a) trouvée pour les différentes droites montre que l'erreur est faible.

La valeur (proche de 1) des coefficients de corrélation permet de justifier la relation affine trouvée entre la concentration de l'antibiotique et le diamètre d'inhibition.

$$\begin{aligned} \blacksquare \text{ Streptomycine } & : y = 0,0066 x + 1,2404 \\ & \quad \quad \quad \underline{r = 0,9843} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \blacksquare \text{ Ciprofloxacine } & : y = 0,0019 x + 0,2011 \\ & \quad \quad \quad \underline{r = 0,9633} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \blacksquare \text{ Rifampicine } & : y = 0,0029 x + 0,569 \\ & \quad \quad \quad \underline{r = 0,997} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \blacksquare \text{ Isoniazide } & : y = 0,0008 x + 2,952 \\ & \quad \quad \quad \underline{r = 0,962} \end{aligned}$$

Disposant de l'équation de la droite de régression, on peut alors effectuer des interpolations, pour calculer l'ordonnée de points intermédiaires, mais aussi des extrapolations pour prévoir les valeurs que prendra la variable test dans l'avenir.

Malgré le soin apporté à leur élaboration, des divergences de pentes demeurent d'un laboratoire à l'autre ; si bien qu'il n'a pas été jusqu'à ce jour possible d'adopter des droites de régression universellement acceptées.

- La fidélité

La fidélité de la procédure est exprimée en terme de variance, d'écart type et de coefficient de variation [35].

La répétabilité (ou fidélité intra-essai) et la reproductibilité sont évaluées à l'aide d'un même schéma expérimental, dont une trame générale est présentée dans les *annexes 7* et *8*.

Nous entendons par « groupe », une série de dosages effectués dans des conditions de répétabilité. Cela signifie que les « n » dosages sont réalisés avec la même méthode de diffusion sur gélose, sur un échantillon initial, dans le même laboratoire, par le même opérateur utilisant le même équipement. Il y a lieu d'insister sur le fait que les résultats des « n » dosages sont indépendants et proviennent de la répétition de la totalité du dosage (de la préparation jusqu'au résultat final).

Les « k » groupes de dosages répondent aux conditions de reproductibilité. Cela signifie que les résultats des dosages sont obtenus avec la même technique sur un échantillon homogène à des jours différents, et/ou avec un équipement différent dans ce même laboratoire.

Les résultats du calcul des paramètres de validation des différents médicaments antituberculeux testés permettent de constater que les valeurs de S_r (écart type de répétabilité) et S_R (écart type de reproductibilité) sont faibles :

● ciprofloxacine	$S_r = 0,577$	$S_R = 0,577$
● streptomycine	$S_r = 0,477$	$S_R = 0,768$
● rifampicine	$S_r = 0,881$	$S_R = 0,881$

- isoniazide $S_f = 0,577$ $S_R = 0,577$

Les valeurs des coefficients de variation ont été jugées satisfaisantes aux différentes concentrations. Le test de Cochran (*Annexe 9*) n'identifie pas d'hétérogénéité significative entre les variances [27].

En effet, pour toutes les molécules, la $C_{\text{calculé}}$ est inférieure à la C_{critique}

- ciprofloxacine $C_{\text{calculé}} = 0,41$
- streptomycine $C_{\text{calculé}} = 0,625$
- rifampicine $C_{\text{calculé}} = 0,687$
- isoniazide $C_{\text{calculé}} = 0,45$

N.B. : La C_{critique} pour 3 variances à 3 ddl (degré de liberté) chacune et un risque de 5 % = 0,871 (tableau : valeurs critiques pour le test de Cochran, *annexe 9*).

Synthèse

La méthode de diffusion sur gélose est ainsi validée parce qu'il a été prouvé qu'elle est robuste, linéaire, répétable, reproductible dans le domaine de concentrations pré-établies.

L'incertitude sur un résultat en routine est de $\pm 0,018$ sur des concentrations exprimées en unité log.10 [27].

Cette incertitude est satisfaisante par rapport au niveau de précision souhaitée.

La validation n'est cependant pas une opération que l'on effectue une fois pour toutes. Même lorsque les méthodes d'essai normalisées (par exemple ISO, AOAC...) sont considérées comme validées, tout laboratoire doit apporter la preuve que la méthode est maîtrisée en interne.

CONCLUSION



Alors que la réduction du problème posé par la tuberculose semblait accessible à un nombre de plus en plus grand de pays aux approches de l'an 2000, une augmentation du nombre de cas de tuberculose a été enregistrée dans le monde au cours de la dernière décennie.

Devant cette nouvelle « épidémie », la lutte contre la tuberculose a été proclamée « urgence mondiale ».

La surveillance régulière de l'activité des antituberculeux est considérée comme un moyen objectif pour évaluer l'efficacité d'un Programme National de Lutte contre la tuberculose.

En effet, lorsqu'il s'agit d'antituberculeux, la qualité et l'activité sont primordiales pour assurer l'efficacité nécessaire au traitement.

Ce travail entrepris sur les antibiotiques antituberculeux essentiels à savoir la rifampicine, l'isoniazide, la streptomycine, la ciprofloxacine a pour but de valider des essais, et de vérifier la fiabilité des tests de validation par l'établissement de droites de régression.

Le respect des normes d'assurance qualité à toutes les étapes de nos manipulations s'est fait en validant, les appareils utilisés (par des fiches techniques de contrôle), les milieux de cultures, les réactifs, les souches de références.

L'activité des médicaments sur les différentes souches a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose qui offre plusieurs avantages, parmi lesquels la simplicité de sa mise en œuvre et l'utilisation d'un matériel peu coûteux.

Les résultats des essais préliminaires permettent de dire que cette méthode de diffusion sur gélose est bien adaptée et est efficace pour le contrôle microbiologique de l'activité des antituberculeux testés. En effet, toutes les molécules se sont montrées actives sur les germes.

➤ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 a montré une bonne sensibilité pour la rifampicine (92,19%) et la streptomycine (99,30%).

➤ Sur *Escherichia coli* ATCC 25922, l'activité de la ciprofloxacine (96,78%) et de l'isoniazide (98,10%) s'est révélée efficace.

La méthodologie de validation proposée consiste à définir les caractéristiques quantitatives (linéarité, répétabilité, reproductibilité) qui permettent d'apprécier si l'ensemble des étapes est correct.

En plus d'être une exigence réglementaire, la validation doit également être une exigence de la part du laboratoire lui-même, dans une optique de qualité, de sécurité et de meilleure maîtrise des procédés.

Les valeurs des coefficients de corrélation justifient pleinement la relation affine trouvée entre les variables (x et y) ; en effet, elles sont toutes proches de la valeur standard 1. Les équations de droite de régression permettront de faire les estimations acceptables.

Les résultats des essais proprement dits jugent la procédure de la méthode satisfaisante, compte tenu des valeurs des coefficients de variation de répétabilité comprises entre 0 et 4,598 % et celles des coefficients de variation de la reproductibilité, toutes inférieures à 5%.

L'écart type a permis de caractériser la précision d'un résultat isolé.

L'analyse statistique des données a donc mis en évidence :

➤ la parfaite capacité de la méthode de diffusion sur gélose à obtenir la solution demandée ;

➤ la bonne prédiction des résultats grâce aux droites de concordance.

Par ailleurs, cela n'empêche pas l'amélioration des méthodes utilisées pour assurer la qualité des médicaments dans la mesure où nous savons que l'emploi des nouvelles technologies exige, pour être efficace et applicable, une volonté politique et des moyens hors de portée des Etats.

C'est pour ces raisons qu'il nous semble indispensable de mettre en place des systèmes fiables, efficaces et à notre portée, afin d'assurer la qualité des médicaments.

BIBLIOGRAPHIE

A decorative graphic element consisting of a horizontal bar and a vertical bar meeting at a right angle, with a 3D effect. The horizontal bar is on the left and the vertical bar is on the right, both in a light gray color.

- 1. AFNOR (Association Française de Normalisation)**
Recueil de normes françaises.
NFT 72-150, Paris, 1989, 2^{ème} édition : 3-5.
- 2. AIT-KHALED N. et ENARSON D.**
Tuberculose.
Manuel pour les étudiants en Médecine.
OMS-UICTMR, 1999, WHO/CDS/TB/9, **272**: 99-109.
- 3. ANHALT J.P.**
Preparation and dosage of antimicrobial solutions.
In Manuel of clinical Microbiology, Lennette, Sparling and Truant Eds.
ASM, Washington DC, USA, 1980: 496.
- 4. AZELE FERRON R. et Cie**
Bactériologie médicale à l'usage des étudiants de médecine.
12^{ème} édition, 1983 : 11-16 ; 24-27 ; 122-126.
- 5. BASCHUNG-BERTRAND M., BEAU-TEMPS R. et coll.**
Validation analytique.
Commentaire sur la note explicative : rapport d'une commission SFSTP.
STP Pharma, 1990 : 6-8, 588-591.
- 6. BASS J.B.J.**
Tuberculin test, preventive therapy and elimination of tuberculosis.
Am. Rev. Resp.Dis., 1990, **141**: 812-813.
- 7. BAUER A., KIRBY W., SHERRIS J., TURK M.**
Antibiotic susceptibility testing by a standardized disc method
Am. J. Clin. Pathol., 1966, **45**: 493-496.

8. BERAUD J.

Le technicien d'analyses biologiques.

Guide théorique et pratique, éditions TEC et DOC., 2001.

Editions Médicales Internationales : 895-900 ; 1740.

9. CAPORAL G.J. et NIVE J.M.

Guide de validation analytique.

Rapport d'une commission STSTPI Méthodologie.

**10. CARBONELLE B., DENIS F., MARMONIER A., PINON G.,
VARGUES R.**

Bactériologie médicale.

Techniques usuelles : 227-244; 269-290.

11. CHAULET P.

The supply of antituberculosis drugs and national drugs policies.

Tuber. Lung. Dis., 1992, **73**: 295-304.

12. CHRETIEN J.

Tuberculose et VIH

Bull. Acad. Nat. Med., 1994, **178**: 1045-1068.

13. CHRETIEN J.

Tuberculose.

In : Abrégé de Pneumologie, Paris, Masson, 1983 : 319-379.

14. DAUTZENBERG B., DEKIMECHE A.

Chimiothérapie antituberculeuse.

Editions Techniques, Encycl. Méd. Chir. Pneumologie, 6-019-A-35, 1995 : 10p.

15. DELDESHEM.

Pharmacologie chimique et contrôle des médicaments.

Rapport sur un symposium, Copenhague, 1979 : 15-16.

16.DE LOUVOIS J.

Factors influencing the assay of antimicrobial drugs in clinical samples by the agar plate diffusion method..

J. Antimicrobial Chemother., 1982 : 253-265.

17.DETOLLE S.

Contribution à l'interprétation d'un contrôle de qualité des médicaments.

Mémoire pour le Concours du Prix de l'Internat en Pharmacie des Hôpitaux de Paris, 1988.

18.DIATTA H.W.

Validation des méthodes de contrôle microbiologique de différents médicaments antifongiques.

Thèse Pharm., Dakar, 2003, n°8.

19.DIRECTION GENERALE DE LA SANTE DE FRANCE.

Maladies à déclarations obligatoires en 1994.

Bull. Epidémiol. Hebd., 1995, **40** : 177-179.

20.DIOP A.

Validation des méthodes de contrôle microbiologique de différents médicaments antiseptiques.

Thèse Pharm., Dakar, 2003, n°44.

21.DIOP C.

Contrôle de qualité des antituberculeux majeurs utilisés par le Programme National de Lutte contre la Tuberculose (PNT).

Thèse Pharm., Dakar, 2001, n°05.

22.DUVAL J., SOUSSY C.J.

Abrégé de l'antibiothérapie

4^{ème} édition Masson, Paris, (1977, 1990) : 75 -100.

23.ENARSON D., RIEDER H., ARNADOTTIR T., TREBUCQ A.

Prise en charge de la tuberculose.

Guide pour les pays à faibles revenus.

UICMR, 5^{ème} édition, 2000 : 5 -26.

24.ERMER J., PLOSS H.J.

Validation in pharmaceutical analysis. Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, 37: 859-870.

<http://www.elsevier.com/locate/jpba>.(consulté le 27/06/2005).

25.FEINBERG M.

Organiser rationnellement les essais, une nécessité pour optimiser la préparation des échantillons.

Analysis, 1988, 20 : 23-25.

26.FEINBERG M.

L'assurance qualité dans les laboratoires agro-alimentaires et pharmaceutiques.

Editions TEC et DOC, Paris, 1998 : 309.

27.GIBELIN N., NABET P., POIRIER B., RIGAL H.

Guide de validation des méthodes de dosage biologique.

STP Pharma Pratiques, 2002, 12 : 1-19.

28.GICQUEL B.

Epidémiologie moléculaire de la tuberculose.

Ann. Inst. Pasteur, 1993, 4 : 188-192.

29.GLOBAL FUND TO FIGHT AIDS, TUBERCULOSIS AND MALARIA

Fonds Mondial de Lutte contre le SIDA, la Tuberculose et le Paludisme.

[http : //www.globalfundatm.org/proposals/round1/fshetts/haiti.html](http://www.globalfundatm.org/proposals/round1/fshetts/haiti.html), Genève, 1982 : 253-265 (consulté le 25 avril 2005).

30.GUEYE C.

Contribution au contrôle de qualité des médicaments génériques dans les centres de santé de Dakar.

Thèse Pharm., Dakar, 1996, n°71.

31.GUPTA R., BEG Q.K., LORENZ P.

Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications.

Appl Microbiol Biotechnol, 2002, **59**: 15-32.

32.HUCHON G.

Tuberculose.

Editions Scientifiques, Techniques & Médicales, 1994 : 17-22.

33.HUCHON G.

Tuberculose et mycobactérioses non tuberculeuses.

Encycl. Méd. Chir. Pneumologie, 6-019-A-33, 1997 : 20 p.

34.ISO 5725-1987.

Fidélité des méthodes d'essai. Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode d'essai normalisée par essais inter laboratoires

Indice de Classement AFNOR : X06-04.1.

35.ISO 9000.

Normes pour la gestion de la qualité et l'assurance de la qualité en conception, développement, production, installation et soutien après vente.

Genève, 1988.

36.JEAN F., FRANCOIS R., WILLY H.

Précis de bactériologie clinique.

Mycobactéries et Antibiotiques, n°56.

37. JEHL F., CHOMARAT M., WEBER M., GERARD A.

De l'antibiogramme à la prescription.

Editions Bio Mérieux, 1996 : 24-26.

38. KOSHI A.

The global tuberculosis situation and the new control strategy of the world
Health Organisation

Tubercle, 1991, **72**: 1-6.

39. LANET J.

Le médicament : éthique et réalité industrielle. La qualité pharmaceutique.

Edition de santé, Paris, 1991, n°3 : 215.

40. LEHIR E., BILLET A., CARDENNE M., EUZENA A., FAUSSATA I.

Guide pour l'élaboration du manuel qualité d'une entreprise de fabrication
de médicaments : rapports d'une commission SF.

STP Pharma Pratiques., ISSN 1997, vol. n°5 : 1157-1497.

41. MACONDO E.A.

Utilisation du MGIT pour le diagnostic et la sensibilité aux antituberculeux
et de la RAPD pour la caractérisation de souches de *M. tuberculosis* isolées à
Dakar.

Thèse 3ème Cycle, Option Microbiologie, Dakar, 1998, n°33.

42. MATTER D., CHAULET P., HARRIES A.

Le traitement de la tuberculose : principe à l'intention des programmes
nationaux.

2ème Edition, OMS, Genève, 1997 : 79p.

43. MINISTERE DE LA SANTE.

Manuel du Programme National de Lutte contre la Tuberculose.

2ème édition, Sénégal, 1999.

**44.MULLER-SERIEYS C., BERGOGNE-BEREZIN E., ROWAN C.,
DROMBET M.C.**

Imipenem penetration into bronchial secretions.

J. Antimicrob. Chemother., 1987, **20** : 618-619.

45.MURAY J., ROUILLON A.

La tuberculose dans les pays en développement.

Importance, stratégie de lutte et coût.

Bull. Int. Union Tuberculing Dis., 1990, **65**: 6-26.

46.NDIAYE M.L.

Validation des méthodes de contrôle microbiologique de différents
médicaments antibiotiques.

Thèse Pharm., Dakar, 2003, n°54 : 65.

47.OMS.

Programme Mondial de lutte contre la tuberculose

Principes généraux d'une lutte antituberculeuse efficace.

OMS, WHO/TB/1994 : 79.

48.OMS.

Série de rapports techniques n°210 ; deuxième rapport du comité d'experts
des antibiotiques.

Edition OMS, Genève, 1997 : 106-138.

49.OMS.

Rapport sur la santé dans le monde.

Réduire les risques et promouvoir une vie saine.

OMS, Genève, 2002.

50.OMS.

Rapport sur la santé dans le monde.

Façonner l'avenir.

OMS, Genève, 2003 : 45-54.

51.OMS

Le scandale mondial de la tuberculose.

<http://www.iph.fgov.be/epidemio/morbidat/fr/Zie/ZIEK01.htm>

(consulté le 30/10/04).

52.PHARMACOPEE EUROPEENNE.

IIIème édition, Paris, 1997.

53.PHILIT F., CORDIER J.F.

Actualité de la tuberculose.

Ann. Dermatol. Vénérol., 1995, **122** : 45-49.

54.PIKA C.

Diagnostic rapide de la tuberculose par PCR multiplex à partir du Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT).

Mémoire, 2004.

55.PILLY E.

Tuberculose

In: Maladies infectieuses, Ed. 2M2, 1992 : 453-465.

56.RAPPORT D'UNE COMMISSION SFSTP

Guide de validation analytique.

STP Pharmapratiques, 1992, **2** (4) : 205-226.

57.RATTAN A., KALIA A., AHMAD N.

Multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis: Molecular perspectives

Emerging Infections Diseases, 1998, **4**: 1-19.

58.ROSNER J., STORZ G.

Effects of peroxides on susceptibilities of *Escherichia coli* and *Mycobacterium smegmatis* to isoniazid.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1994, **38**: 1829-1833.

59.TATTEVIN P., CREMIEUX A.C., BOUVET E.

La tuberculose : actualité thérapeutique.

La Presse Médicale, 1996, **25**, n°39.

60.UNITED STATES PHARMACOPEA.

IIIème édition, 1995.

61.VASSAULT A., DUMONT G., LABBE D.

Définitions des critères de qualité d'une méthode d'analyse.

Le Moniteur Internat, 1992, **26**: 20-33.

62.WHO.

Global tuberculosis control.

Geneva, World Health Organisation 2000.

WHO/CDS/TB/2000: **275**.

63.WHO

Antituberculosis drug resistance in the world.

Report 2, Prevalence and trends.

World Health Organisation, Geneva, 2000, *WHO/CDS/TB/2000*, **278**.

64.WHO

Toman's Tuberculosis

Case detection, treatment and monitoring: questions and answer.

Second edition. World Health Organisation, Geneva,

WHO/CDS/TB/2004: **334**.

65.YAMAMOTO S., TOIDA I., WATANABE N., URA T.

In vitro antimycobacterial activities of pyrazinamide analogs

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995: 2088-2091.

ANNEXES



ANNEXE 1

► ENGAGEMENT POLITIQUE DES POUVOIRS PUBLICS

Il doit être garanti par des mesures concrètes, c'est-à-dire par l'allocation de ressources budgétaires durables et suffisantes pour que le programme couvre l'ensemble du territoire national. Pour assurer cette extension nationale du programme :

- la lutte contre la tuberculose doit constituer une activité permanente du système de santé et être intégrée à l'infrastructure sanitaire existante ;
- et la direction technique du programme doit être confiée à une unité centrale composée d'une équipe permanente rompue à la gestion de la lutte antituberculeuse.

Cette équipe a diverses tâches, en particulier :

- élaborer, lancer, superviser et évaluer les activités essentielles du PNT ;
- assurer une liaison permanente avec les spécialistes de la tuberculose afin de se mettre régulièrement au courant des connaissances concernant la tuberculose et d'assurer l'enseignement du PNT à l'université et dans les écoles d'infirmiers.

ANNEXE 2

► LA DETECTION DES CAS PAR UN DEPISTAGE PASSIF

La recherche de la tuberculose doit se faire principalement chez les personnes qui se présentent d'elles-mêmes dans les services de santé pour des symptômes évocateurs de tuberculose.

Ces patients bénéficieront d'examens directs au microscope de leur expectoration, ce qui permettra de confirmer le diagnostic de la majorité des cas de tuberculose pulmonaire et de retrouver ainsi tous les cas contagieux.

Des services de soins primaires efficaces et un réseau de laboratoire de microscopie de qualité contrôlée sont les deux conditions de succès du dépistage des cas dans la communauté.

ANNEXE 3

► TRAITEMENT PAR UNE CHIMIOThERAPIE DE COURTE DUREE

Des mesures techniques doivent permettre de guérir la majorité des malades identifiés :

- les malades doivent bénéficier d'une chimiothérapie de courte durée standardisée contenant de la rifampicine au moins pendant la phase initiale, en assurant des conditions de prise en charge permettant de garantir la guérison définitive. Cette chimiothérapie doit être assurée au minimum à tous les cas dont la positivité des frottis d'expectoration est confirmée ;
- les régimes de chimiothérapie doivent être des régimes standardisés et hiérarchisés et différents selon les antécédents thérapeutiques des malades, afin d'éviter l'émergence des souches résistantes. Le choix des régimes de primo-traitement se fera selon le contexte de chaque pays parmi les régimes préconisés par l'OMS et l'UICMR pour les nouveaux cas : les échecs et les rechutes recevront toujours le régime de retraitement de 9 mois ;
- des procédures spéciales doivent assurer la protection de la rifampicine et l'observance du traitement, traitement directement observé par le personnel de santé et organisation de la prise en charge permettant d'éviter les abandons de traitement.
- d'autres mesures, visant à protéger la rifampicine, d'ordres réglementaires, sont de la responsabilité des autorités sanitaires : utiliser la rifampicine dans des comprimés associés (à l'isoniazide au moins), interdire la vente de rifampicine dans le marché privé, interdire son utilisation pour d'autres affections.

ANNEXE 4

► APPROVISIONNEMENT REGULIER EN MEDICAMENTS

Les médicaments antituberculeux doivent être inscrits sur la liste des médicaments essentiels adoptée dans les pays, mais la commande des médicaments doit être sous la responsabilité directe du chef du PNT :

- la commande des médicaments doit être faite en se basant sur le nombre de cas enregistrés durant le semestre précédent et sur le niveau des stocks. Des stocks de sécurité de 3 mois doivent être prévus au niveau des districts et au niveau provincial et de 6 mois au niveau central.

La planification des achats doit être faite de manière à éviter toute rupture de stock, les délais de livraison étant de 6 mois au moins.

ANNEXE 5

► EVALUATION REGULIERE DES ACTIVITES DU PROGRAMME

Ce système doit permettre de disposer d'informations appropriées et précises sur les activités du programme. Il est fondamental pour gérer le programme et évaluer ses différentes activités afin de maintenir ou améliorer leur qualité. Il comprend obligatoirement :

- un registre de déclaration de tous les cas de tuberculose mis au traitement dans le district permettant de consigner toutes les caractéristiques du statut des malades et de leur devenir jusqu'à la fin du traitement ;
- des rapports (trimestriels) sur la notification des cas et sur le devenir des cohortes de malades après traitement qui seront adressés au niveau central.

ANNEXE 6 : ETUDE DE LA LINEARITE

1. Calcul des S_j^2 : variance des résultats obtenus pour chaque concentration

↓
Comparaison des S_j (test de Cochran)

↙
Variances homogènes

↘
Variances non homogènes

↓
Recherche des causes possibles :
- relation entre la variance des résultats et la concentration (dans ce cas, une transformation sur x et y, ou une réduction de l'intervalle de mesure, peut être envisagée) ;
- présence d'une valeur aberrante ? faire une investigation)

↓
2. Estimation des paramètres a et b de la droite de régression (méthode des moindres carrés)

$$y = a + bx$$

avec a = résultat attendu (éventuellement transformé)
et y = résultat mesuré (éventuellement transformé)

↓
3. Test d'écart à la linéarité (test F, seuil 1 %)

↙
Pente significative

↘
Pente non significative
Il n'y a pas de dépendance linéaire entre x et y. Faire une investigation, puis retour au développement

↓
4. Test d'écart à la linéarité (test F, seuil 5 %)

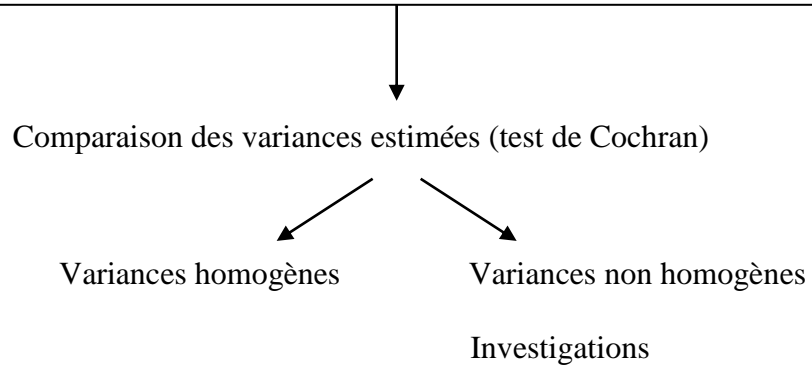
↙
Test non significatif

↘
Test significatif
La linéarité n'est pas démontrée.
Une analyse graphique peut suggérer
Une transformation de variables (logarithme, racine carrée ou une réduction de l'intervalle de mesure).

ANNEXE 7

ETUDE DE LA REPETABILITE

1. Calcul de la variance des résultats observés dans chacun des k groupes d'essais



2. Calcul de la variance de répétabilité : S_r^2

Elle est obtenue en calculant la moyenne pondérée des k variances.

ANNEXE 8

ETUDE DE LA FIDELITE INTERMEDIAIRE

1. Calcul de la variance des résultats entre les groupes d'essais



2. Calcul de la variance de fidélité intermédiaire S_R^2

Elle est estimée par la somme de la variance de répétabilité S_r^2 (variance intragroupe) et de la variance intergroupes S_g^2 :

$$S_R^2 = S_r^2 + S_g^2$$

ANNEXE 9

TEST D'HOMOGENEITE DES VARIANCES A L'INTERIEUR DES GROUPES : TEST DE COCHRAN

Statistique calculée :

$$C = \frac{S_{\max}^2}{\sum_{j=1}^k S_j^2}$$

avec S_{\max} la plus grande des variances S_j des k groupes d'essais

- C est inférieur à la valeur critique de la table au seuil α → variances homogènes
- C est supérieur ou égal à la valeur critique de la table au seuil α → la valeur la plus élevée des variances est dite « suspecte ».

Valeurs critiques pour le test de Cochran

n	2		3		4	
	1%	5%	1%	5%	1%	5%
2	-	-	0,995	0,975	0,979	0,939
3	0,993	0,967	0,942	0,871	0,883	0,798
4	0,968	0,906	0,864	0,768	0,781	0,684

Le tableau donne des valeurs critiques du test de Cochran en fonction du risque d'erreur, du nombre de répétitions (n) et du nombre de groupes (j).

REMARQUE :

La norme ISO 5725-2 : 1994 (F), chapitre 7.3.3.3., précise que « le critère de Cochran ne s'applique strictement que lorsque tous les écart-types sont calculés à partir du même nombre de résultats obtenus sous des conditions de répétabilité.