



***INTRODUCTION***

La microbiologie médicale s'intéresse tout particulièrement aux micro-organismes pathogènes, responsables de maladies infectieuses. Un des principaux rôles du bactériologiste consiste à aider le clinicien dans le choix d'une thérapeutique, en testant la sensibilité à divers antibactériens (antifongiques et antibiotiques) d'un micro-organisme en présence d'un antibiotique ou d'un antifongique et, d'un point de vue plus pratique, de prédire la réussite ou l'échec d'un traitement.

Mais au préalable, il faut assurer une bonne qualité de ces médicaments. Or, le contrôle du marché pharmaceutique est un véritable problème pour les pays en voie de développement et tous signalent l'existence de circuits d'approvisionnement illicites. Le marché parallèle est le lieu de prédilection pour écouler les médicaments non conformes.

Ces derniers le sont soit :

- par sous dosage pouvant l'être après dégradation du principe actif suite à de mauvaises conditions de stockage ou de transport ;
- par substitution totale du principe actif par un autre, liée à une erreur de conditionnement ;
- par défaut de fabrication comme l'absence d'uniformité de masse, un temps de désagrégation supérieure à la normale ou un surdosage.

Face à cela, le laboratoire national de contrôle des médicaments (LNCM) a été créé pour assurer le contrôle de qualité des médicaments.

Le but de notre travail était d'établir des droites de concordance ou droites de régression afin de vérifier la reproductibilité, la répétabilité et la fiabilité des tests de validation.

Tel est l'objet de notre recherche avec une méthode de dosage microbiologique des antibactériens (antibiotiques et antifongiques) par une technique de diffusion en milieu gélosé.

Ce travail comprend deux parties :

- la première partie est consacrée aux médicaments antibiotiques et antifongiques en général du point de vue de la qualité et du contrôle ;
- la deuxième partie expose la méthodologie et commente les résultats de l'étude.

**PREMIERE PARTIE**

***GENERALITES SUR LES  
MEDICAMENTS  
ANTIBIOTIQUES  
ET ANTIFONGIQUES***

## **CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES ANTIMICROBIENS**

### **1. DEFINITIONS**

#### **1.1. Asepsie**

Un milieu est dit septique lorsqu'il contient des microorganismes : il est dit aseptique dans le cas contraire.

Des conditions rigoureuses d'asepsie sont requises en milieu hospitalier dans les services dits à haut risque (réanimation, chirurgie) [22]. Dans les salles d'opération, on cherche par tous les moyens possibles à éviter la contamination du champ opératoire (tenues spéciales du personnel, stérilisation du matériel, préparation du malade).

#### **1.2. Désinfection**

La désinfection est définie comme une opération, au résultat momentané, permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou les virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux microorganismes présents au moment de l'opération [2].

L'usage du terme « décontamination » comme synonyme de « désinfection » est prohibé, car les décontaminants s'utilisent sur du matériel souillé (matériel médico-chirurgical, médico-secouriste ....) contrairement aux désinfectants qui s'utilisent sur des surfaces inertes.

#### **1.3. Décontaminants**

La décontamination est définie comme une opération, au résultat momentané permettant d'éliminer, ou d'inhiber les microorganismes indésirables en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux microorganismes

présents au moment de l'opération ; les termes « de vie », « de mort » et de « tuer » appliqués aux microorganismes, se réfèrent à la capacité ou à l'incapacité définitive de réplication du matériel génétique des microorganismes.

#### **1.4. La stérilisation**

La stérilisation est l'opération qui a pour but de tuer les microorganismes contenus dans une préparation.

Le matériel traité est dit stérile lorsque le résultat est acquis, c'est-à-dire lorsque aucun microorganisme n'est revivifiable ou n'est capable de se développer [4].

Le résultat de la stérilisation doit être permanent, ce qui requiert un emballage imperméable à toute recontamination avec une tolérance de non-stérilité de  $10^{-6}$  (un objet non rigoureusement stérile sur un million).

Les difficultés d'éviter la recontamination conduisent à définir une date de péremption.

La mort ou l'inactivation pour une bactérie est bien une perte irréversible de son pouvoir de reproduction (croissance et division).

Les agents utilisés pour assurer la stérilisation sont :

- physiques : température (chaleur sèche - chaleur humide), les radiations
- chimiques

#### **1.5. Définitions complémentaires**

- **Bactéricide**

Produit ou procédé ayant la propriété de tuer les bactéries dans des conditions définies.

- **Bactériostase**

C'est l'état d'une population bactérienne dont la multiplication est momentanément inhibée.

- **Bactériostatique**

C'est un produit ou un procédé ayant la propriété d'inhiber momentanément des bactéries dans des conditions définies.

- **Antibactérien**

Ceci qualifie un produit ou un procédé dont on ne précise pas si son activité est bactéricide ou bactériostatique.

- **Fongicide**

C'est un produit ou un procédé ayant la propriété de tuer les champignons, y compris leurs spores dans des conditions à préciser.

- **Fongistase**

Etat d'une population dont le développement est momentanément inhibé.

- **Fongistatique**

Produit ou procédé ayant la propriété d'inhiber momentanément le développement des champignons dans des conditions définies.

- **Antifongique**

Qualifie un produit ou un procédé dont on ne précise pas si son activité est fongicide ou fongistatique.

## **2. PRINCIPALES MOLECULES D'ANTIMICROBIENS**

### **2.1. LES ANTIBIOTIQUES**

#### **2.1.1. Les $\beta$ -lactamines**

##### **2.1.1.1. *Mécanismes d'action* [4, 11, 29]**

Ils agissent sur la paroi bactérienne en inhibant la synthèse du peptidoglycane conduisant à un effet bactériostatique. Le peptidoglycane est directement exposé chez les germes Gram (+) mais protégé chez les germes Gram (-) par une membrane lipidique supplémentaire empêchant l'action directe des antibiotiques.

#### **2.1.1.2. Caractères physiques [35]**

L'amoxicilline c'est une poudre blanche à sensiblement blanche, très hygroscopique, très soluble dans l'eau, assez soluble dans l'éthanol, très peu soluble dans l'acétone et pratiquement insoluble dans l'éther. Elle se conserve dans un récipient étanche à l'abri de la lumière et à une température ne dépassant pas 25°C.

#### **2.1.2. Les aminosides**

##### **2.1.2.1. Mécanisme d'action [4]**

Les aminosides agissent sur la synthèse protéique en se fixant sur la fraction 30S du ribosome bactérien au niveau de protéines particulières. Il s'en suit une altération ou une inhibition complète de la synthèse protéique. La fixation au ribosome se traduit aussi par une augmentation du transfert à travers la membrane cytoplasmique qui se trouve désorganisée et dont le fonctionnement est altéré. Cet effet et d'autres mécanismes encore imprécis expliquent l'action bactéricide de la plupart des aminosides.

##### **2.1.2.2. Caractères physiques [32]**

Gentamicine sulfate : la gentamicine est le sulfate des fractions C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>1a</sub> de la gentamicine produite au cours de la croissance de *Micromonospora purpurea*. C'est une poudre blanche ou couleur crème inodore, soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol, éther R et chloroforme R. La poudre se conserve dans un récipient étanche à l'abri de la lumière.



### **2.1.3. Les cyclines**

#### ***2.1.3.1. Mécanismes d'action [4]***

Les tétracyclines inhibent la phase d'élongation de la synthèse protéique en empêchant la fixation du complexe [aminoacide-TRNA] sur le complexe [RNAm-ribosome]. D'autres mécanismes d'action sont également possibles dont une altération de la membrane cytoplasmique.

#### ***2.1.3.2. Caractères physiques***

Les chlorhydrates de tétracycline sont des cristaux jaunes ou poudres cristallines jaunes, inodores, solubles dans environ 100 parties d'eau et 250 parties d'éthanol = 75 g/LTS, pratiquement insoluble dans l'acétone, le chloroforme R et l'éther R.

Ils se conservent dans un récipient étanche à l'abri de la lumière. Même en l'absence de la lumière s'altère à l'air humide d'autant plus vite que la température est élevée. La poudre a un goût amer.

### **2.1.4. Les macrolides**

#### ***2.1.4.1. Mécanismes d'action [4]***

Les macrolides se fixent sur la sous-unité 50S. Les grands macrolides (spiramycine, josamycine ...) inhibent les premières étapes de la synthèse protéique, ce qui se traduit par un défaut de fixation des aminoacyl-tRNA. Les macrolides de petite taille (Erythromycine, Aléandomycine ...) agissent à un stade plus tardif en inhibant la translocation.

#### ***2.1.4.2. Caractères physiques [25, 32]***

L'érythromycine est un mélange de substances produites par certaines souches de *Streptomyces erythreus*, constituées principalement d'érythromycine A et d'une petite quantité d'érythromycine B et C. Ce sont des cristaux ou poudre

blanche ou légèrement jaune, inodore ou presque. La poudre est soluble dans 100 partie d'eau mais moins soluble dans l'eau chaude, facilement soluble dans l'éthanol = 750 g/LTS, éther R, chloroforme R.

Elle se conserve dans un récipient étanche à l'abri de la lumière, l'érythromycine est légèrement hygroscopique.

### **2.1.5. Sulfaméthoxazole + Triméthoprim**

#### ***2.1.5.1. Mécanismes d'action [4]***

Ils agissent en inhibant la synthèse des folates et ont une action antimétabolite. L'acide folique nécessaire au métabolisme du DNA et certains acides aminés doivent être synthétisés par les bactéries car elles ne peuvent pas incorporer les folates exogènes. Ils inhibent compétitivement la dihydroptérate synthétase dont le substrat normal est l'acide para-aminobutyrique (P.A.B.).

#### ***2.1.5.2. Caractères physiques [36]***

- Sulfaméthoxazole : poudre blanche cristalline ou blanc-jaunâtre, inodore. Elle est très peu soluble dans l'eau, soluble dans 50 parties d'éthanol = 750 g/LTS et dans trois parties d'acétone R. Elle se conserve dans un récipient clos à l'abri de la lumière.

- Triméthoprim : poudre blanche cristalline inodore ou presque, modérément soluble dans l'eau, soluble dans le méthanol R et dans le chloroforme R, pratiquement insoluble dans l'éther R. Elle se conserve dans un récipient bien clos.

***Remarque*** : l'activité et la qualité de ces antibiotiques sont déterminées par des méthodes de dosage validées par des paramètres, ce qui permet d'avoir une assurance de la qualité des médicaments utilisés en thérapeutique.

## **2.2. LES ANTIFONGIQUES**

### **2.2.1. Les polyènes [21, 23]**

Les deux principaux polyènes utilisés sont l'amphotéricine B (Fungizone\*) et la nystatine (Mycostatine\*). Plus de 200 molécules à action antifongique élaborées par les actinomycètes appartiennent à cette famille. Elle est caractérisée par un spectre d'absorption aux ultra violets et par un groupe chromophore formé de doubles liaisons conjuguées  $(CH = CH)_n$  d'où le nom de polyènes. Ces derniers ont en outre un grand anneau lactone macro cyclique (*figure 1*) et sont dénommés, pour cette raison, macrolides polyéniques. La partie active de ces composés est l'anneau macrolide, avec une partie rigide lipophile et une partie flexible hydrophile [21].

#### **2.2.1.1. *Amphotéricine B***

##### **2.2.1.1.1. Propriétés physiques**

L'amphotéricine B est un heptaène (*figure 1*), d'un poids moléculaire de 924,09 ; c'est une poudre jaune insoluble dans l'eau et dans l'alcool, soluble dans les solvants organiques : diméthylsulfoxyde (30 à 40 mg/ml) ou diméthylformamide (4 mg/ml). Combinée à des sels biliaires tel que le dexocholate de sodium, l'amphotéricine B est facilement mise en suspension dans un soluté glucosé isotonique à 5 %, réalisant ainsi une suspension colloïdale et non une solution injectable par voie intraveineuse (IV) [9].

La poudre sèche est stable à 4°C en suspension dans un milieu aqueux, il existe une discrète diminution d'activité au bout de 24 heures. L'exposition à la lumière dégrade légèrement la molécule. Ces deux paramètres sont négligeables en thérapeutique humaine. Un flacon d'amphotéricine B injectable contient 50 mg d'amphotéricine B, 41 mg de desoxycholate de sodium et 25,2 mg de tampon phosphate de sodium.

##### **2.2.1.1.2. Cibles cellulaires**

L'amphotéricine B est une molécule lipophile, insoluble dans l'eau à pH physiologique, qui augmente la perméabilité transmembranaire (notamment des membranes fongiques) aux cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ). La déplétion du potassium intracellulaire entraîne secondairement la mort de la cellule. La relative sélectivité de la toxicité de l'amphotéricine B pour les cellules fongiques s'explique de la manière suivante : en solution aqueuse, l'amphotéricine B à l'état de monomères solubles, d'oligomères solubles et d'agrégats insolubles qui se forment successivement lorsqu'on augmente la concentration. Les monomères se lient à l'ergostérol de la membrane de la cellule fongique pour lequel ils ont une forte affinité, ce qui conduit à la formation de canaux.

A plus forte concentration, des oligomères solubles s'insèrent dans la membrane des cellules de mammifères sous l'action favorisante du cholestérol, et forment des canaux. Ainsi, l'action tonique de l'amphotéricine B s'exerce à une même concentration plus basse sur les cellules fongiques que sur les cellules de mammifères.

L'amphotéricine B possède par ailleurs une activité antifongique indirecte, médiée par les macrophages. Elle potentialise l'action de l'interféron-gamma sur les macrophages, action qui se traduit par une synthèse de Tumor Necrosis Factor ( $\text{TNF-}\alpha$ ) de l'interleukine (IL-1) et finalement par une production de monoxyde d'azote (NO). Le NO a une action antifongique, notamment vis-à-vis de *Cryptococcus neoformans* [40]. Cette activité de l'amphotéricine B entraîne une réduction de 1 log CFU/ml en 24 heures pour une concentration de 1 mg/ml en présence de 20 U/ml d'interféron-gamma et de  $10^6$  macrophages. Ce mécanisme pourrait participer à l'action de l'amphotéricine B in vivo, car son efficacité est moindre en cas de leucopénie.

L'amphotéricine B peut également être incorporée dans des vecteurs lipidiques, notamment des liposomes. Les liposomes sont des véhicules consistant en un environnement aqueux de couches phospholipidiques : la dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) et le dimyristoylphosphatidylglycérol

(DMPG) contenant 5 à 10 % d'amphotéricine B par rapport aux lipides. Trois formulations en sont actuellement commercialisées ou en cours de développement :

- l'amphotéricine B liposomal (Ambisome\*) qui consiste en des vésicules unilamillaires de 80 nm contenant 10 % mol d'amphotéricine B ;
- le complexe lipidique d'amphotéricine B (ABLC : Abelcet\*), contenant des lipides et de l'amphotéricine B à une concentration de 33 % mol ;
- la dispersion colloïdale d'amphotéricine B (ABCD : Amphocil® - Amphocec® qui contient du sulfate de cholestérol en qualité équivalente à l'amphotéricine B, formant des particules colloïdales.

Le mélange d'amphotéricine B et d'intralipid® a été également proposé, mais l'absence de formulation commerciale rend difficile, en dehors d'essais thérapeutiques, la généralisation de cette association.

### **2.2.1.2. Nystatine**

La nystatine (Mycostatine\*) est un tétraène d'un poids moléculaire de 926,1. C'est une substance amphotère qui subit une détérioration en milieu acide (*figure 1*). Son mode d'action et ses propriétés antifongiques sont tout à fait comparables à ceux de l'amphotéricine B.

L'absence d'absorption intestinale et la toxicité en cas d'injection intramusculaire ou intraveineuse limitent sa prescription aux mycoses cutanées, vaginales et digestives.

L'incorporation de la nystatine dans des liposomes a permis de l'administrer par voie intraveineuse chez la souris et de documenter son efficacité dans l'aspergillose expérimentale de l'animal neutropénique.

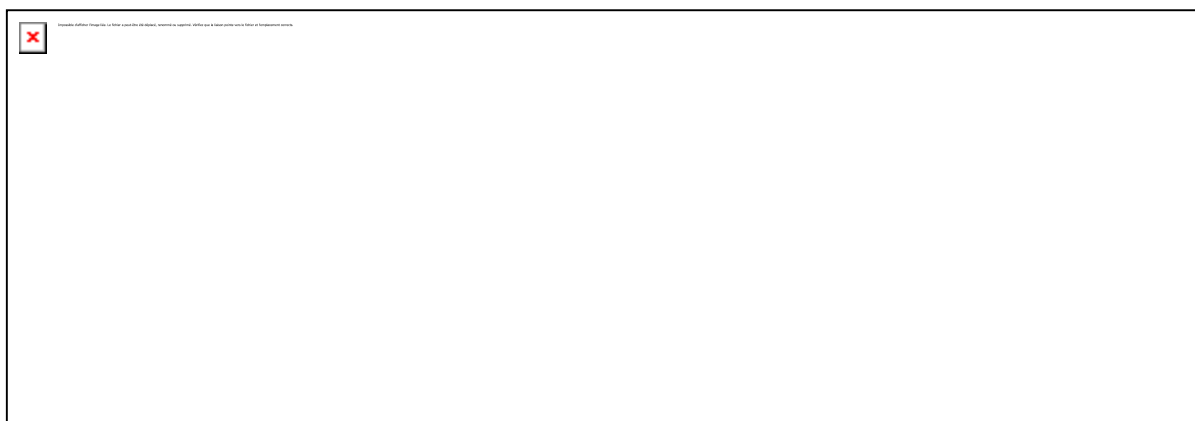
Des études de phase III sont en cours pour évaluer son activité dans le traitement des mycoses systémiques humaines.



**Amphotéricine B (heptaène) :**

**C<sub>47</sub> H<sub>73</sub> O<sub>17</sub> N**

**PM 924,09**



**Nystatine (Tétraène)**

**C<sub>47</sub> H<sub>75</sub> O<sub>17</sub> N**

**PM 926,1**

***Figure 1 : Structure et formule des polyènes [16, 42]***

## 2.2.2. Fluorocytosine [20]

### 2.2.2.1. *Propriétés physiques*

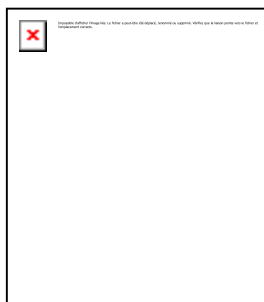
La 5-FC ou fluorocytosine est une pyrimidine fluorée (*figure 2*). C'est une poudre blanche cristalline, faiblement soluble dans l'eau distillée à 20°C (1,2 %), soluble dans l'eau à 60°C ou dans l'alcool. La solution est relativement stable à la température du laboratoire. La présentation orale ne contient pas de sodium. La forme injectable de la 5-FC a pour véhicule un soluté physiologique à 9 pour mille (9 ‰) de NaCl. Le poids moléculaire est de 129,1. La 5-FC est peu liée (10 à 12 %) aux protéines sériques et elle est dialysable.

### 2.2.2.2. *Cibles cellulaires*

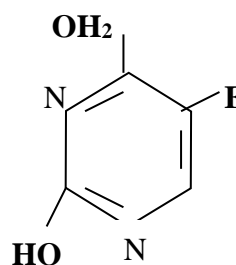
Les deux principaux modes d'action connus sont une perturbation de la synthèse protéique par substitution de 5-fluoro-uracile (5-FC) à l'uracile dans l'acide ribonucléique (ARN) fongique et une altération de la biosynthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) fongique par inhibition de la thymidilate synthétase.

Deux étapes sont indispensables pour que la 5-FC exerce son action : la pénétration dans la cellule fongique (en compétition avec la cytosine) régie par la cytosine perméase et la transformation en 5-FU (toxique) grâce à une cytosine désaminase. L'absence ou la perte de ces enzymes rend le champignon résistant à la 5-FC. Les cellules de mammifères étant pratiquement dépourvues de cytosine désaminase, peu de 5-FU toxique est formée dans les cellules humaines, ou pas du tout.

Dans la cellule fongique, la 5-FU est transformée en 5-Fluoro-uridine qui est mono, di puis triphosphatée et finalement incorporée dans l'ARN à la place de l'uracile, faussant ainsi le code de la synthèse protéique. La production de 5-Fluorodeoxy-uridine diphosphate, puis de 5-fluorodeoxy-uridine monophosphate, inhibiteur non compétitif de la thymidilate synthétase, interfère avec la synthèse de l'ADN du champignon.



**5-Fluorocytosine 5-FC**



**5-Fluorouracile 5-FU**



**Griseofulvine**

***Figure 2 : Structure chimique de la 5-fluoro-cytosine, du 5-fluoro-uracile de la griséofulvine [23]***



### 2.2.3. Imidazolés et triazolés

L'utilisation à partir de 1968, de dérivés azolés obtenus par synthèse chimique, a constitué une étape importante de la thérapeutique antifongique. Tous ces composés ont en commun le noyau azolé (*figure 4*). Le miconazole (DAKTARIN\*) a été le premier imidazolé bien absorbé par voie orale. Il est caractérisé chimiquement par un noyau dioxolanne et un noyau pipérazine.

#### 2.2.3.1. *Propriétés physiques*

Il s'agit de poudre complètement insoluble dans les solvants organiques : polyéthylène glycol, alcools, chloroforme, diméthylformamide, diméthylsulfoxyde. Elles sont hygroscopiques et se conservent plus de 1 an à plus 4°C. Les molécules sont généralement lipophiliques. La liaison avec les protéines plasmatiques et les érythrocytes est proche de 100 %.

#### 2.2.3.2. *Cibles cellulaires*

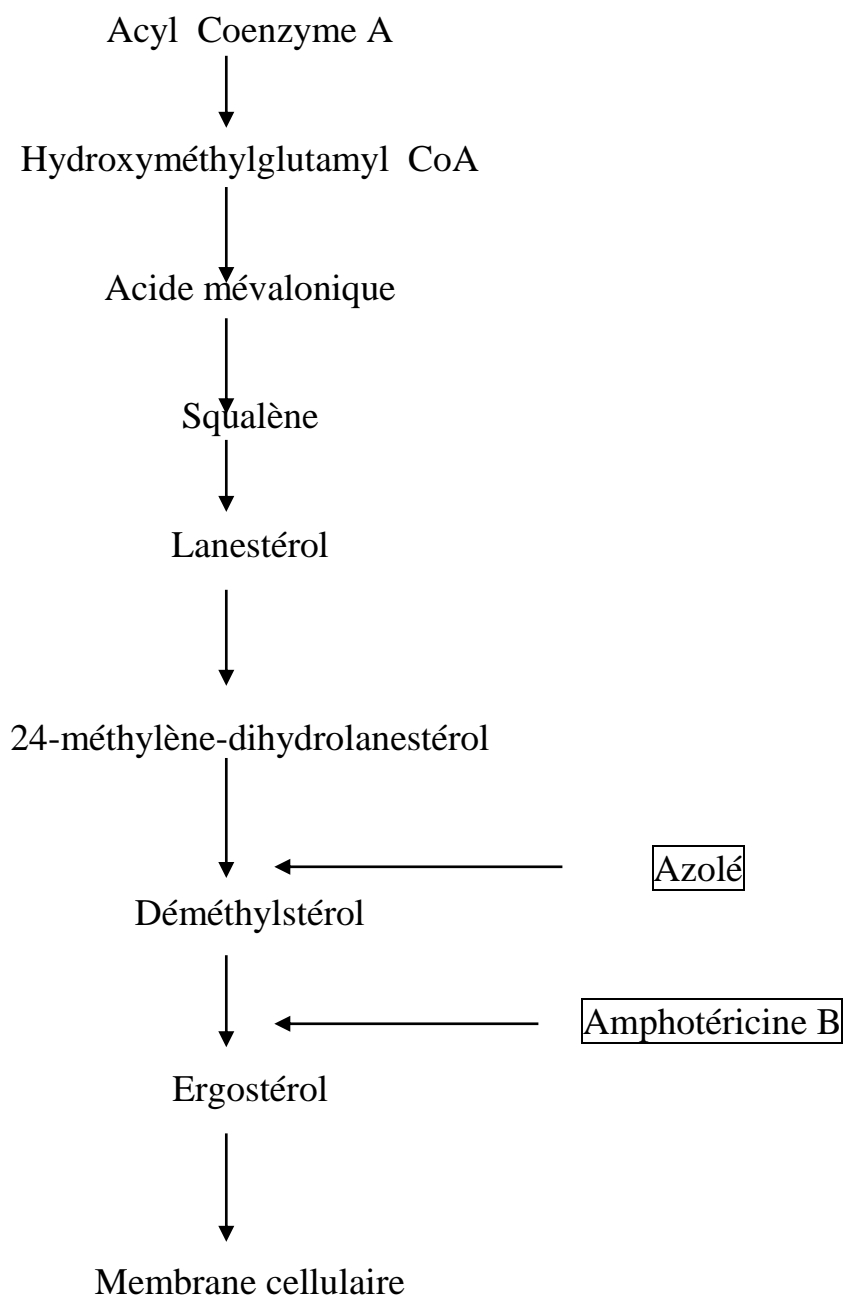
Les antifongiques imidazoles (miconazole, kétoconazole) et les triazolés (fluconazole, itraconazole) (Figure 4) sont des inhibiteurs enzymatiques qui bloquent certains isoenzymes des cytochromes P450 des mitochondries des cellules fongiques [24, 33].

Cette inhibition s'exerce en particulier sur la 14-alpha-déméthylase, qui effectue la transformation du lanestérol en ergostérol, principal stérol membranaire. On observe donc une accumulation des précurseurs dans la chaîne de synthèse : lanestérol et divers 14-méthylstérols.

D'autres modes d'action ont été proposés : lésions directes par fixation sur la membrane avec perte de potassium intracellulaire ; accumulation de peroxyde toxique, résultat de l'interaction des dérivés azolés sur les enzymes oxydatifs.

Outre l'atteinte des systèmes membranaires, ces molécules peuvent altérer la paroi fongique, avec défaut de séparation des bourgeons de la levure mère, et inhiber la formation de *Candida albicans*.

Les triazolés sont nés de la N-substitution des imidazolés. Les propriétés pharmacologiques, le spectre d'activité et surtout la moindre interaction avec le système des cytochromes P-450, séparent les triazolés et les imidazolés. Le mode d'action des antifongiques azolés est résumé dans la *figure 3*.



***Figure 3 : Mode d'action des dérivés azolés sur la synthèse de l'ergostérol, principal stérol membranaire des champignons et cible de l'amphotéricine B [23, 40]***

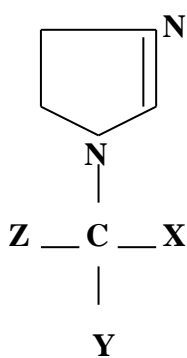
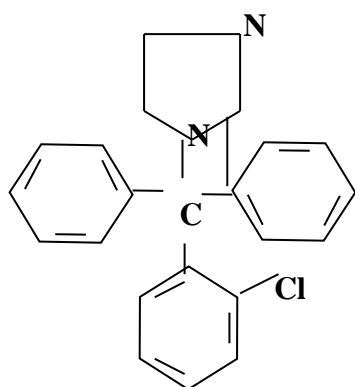
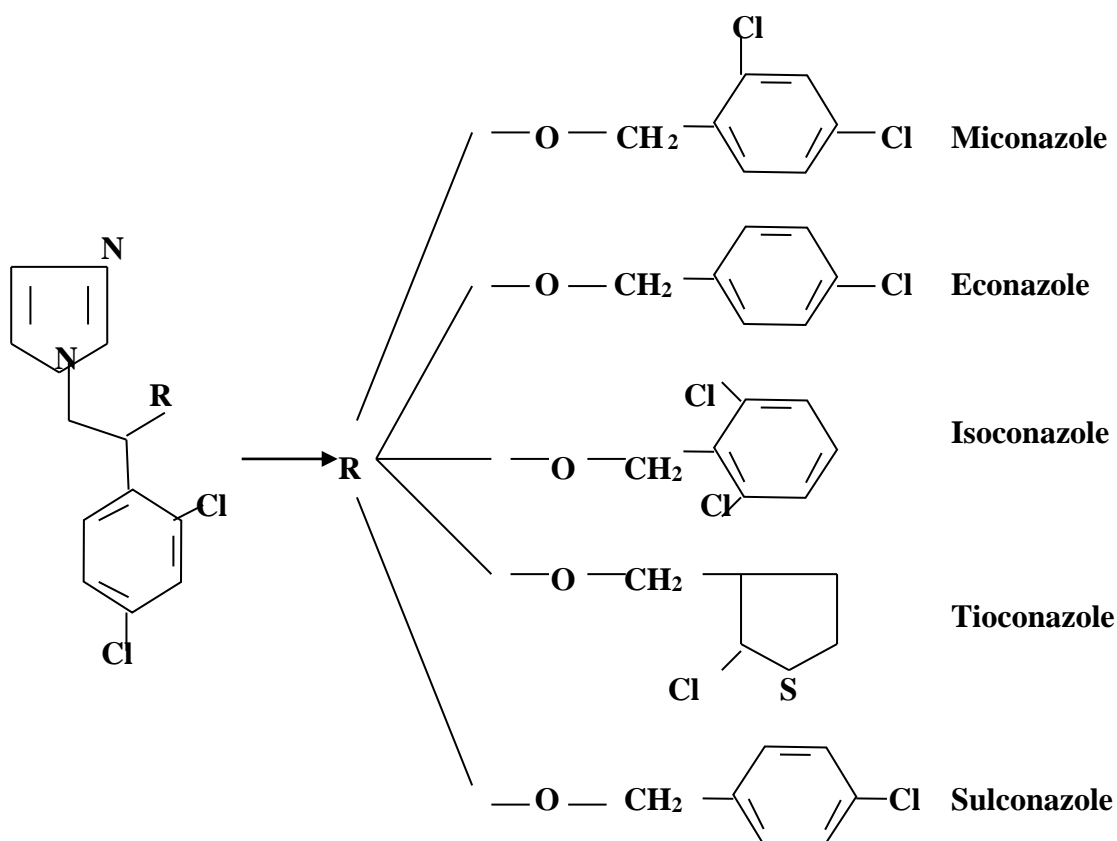
## **2.2.4. Griséofulvine**

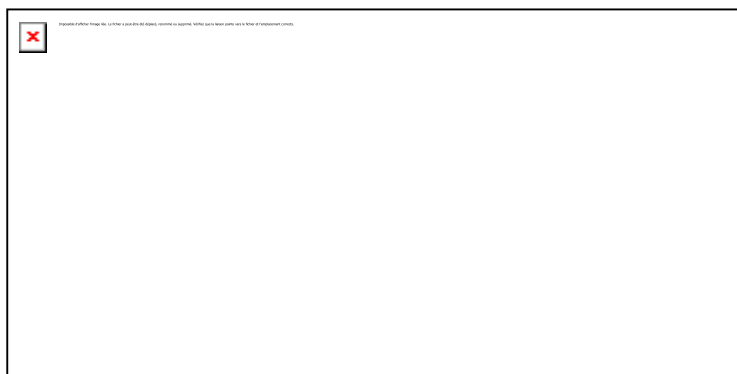
### **2.2.4.1. *Propriétés physiques***

La griséofulvine isolée de *Penicillium griseofulvum* et d'autres *Penicillium sp* se présentent sous forme d'une poudre blanche cristalline de saveur amère (Figure 2). Pratiquement insoluble dans l'eau, elle est facilement soluble dans l'alcool et les solvants organiques. La griséofulvine supporte l'autoclave à condition de ne pas être en solution. Elle est chimiquement stable à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière. Son poids moléculaire est de 352,8.

### **2.2.4.2. Cibles cellulaires**

La griséofulvine inhibe la mitose cellulaire par son action sur les microtubules. Fongistatique, elle est responsable d'altération de la paroi fongique s'accompagnant d'anomalies de développement des hyphes terminaux qui sont élargis, épaissis et enroulés. L'action in vivo est de type fongistatique. L'apparition de résistance est possible.

**Azolés****Clotrimazole**



### Ketoconazole

***Figure 4 : Noyau Azolé et dérivés azolés, biazole [23]***

## **CHAPITRE II : METHODES DE DOSAGE**

### **1. DOSAGES MICROBIOLOGIQUES**

Les méthodes de dosages micro biologiques permettent d'analyser le spectre d'activité antibactérienne d'une substance, mais également de quantifier cet antibiotique : diffusion sur gélose et turbidimétrie.

#### **1.1. Diffusion sur gélose [29]**

Elle consiste à faire diffuser un antibiotique sur un milieu gélosé contenant une souche bactérienne sensible à cet antibiotique. La méthode des disques consiste à déposer des volumes identiques représentant plusieurs dilutions de la substance sur des rondelles de papier buvard. Ces disques sont mis en contact d'une surface gélosée contenant  $10^6$  à  $10^7$  cellules souches indicatrices ou de spores.

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, on mesure les diamètres d'inhibition qui apparaissent sous l'aspect de zones claires.

L'équation de la relation entre le logarithme de la concentration de l'antibiotique et le diamètre des zones d'inhibition est établi dans le domaine de la linéarité, et éventuellement, reporté sur du papier semi-logarithmique.

La zone de linéarité, au sein de laquelle la détermination peut s'effectuer, est définie. L'équation permet de déterminer la concentration de la solution d'antibiotique en fonction du diamètre de la zone d'inhibition et du facteur de dilution.

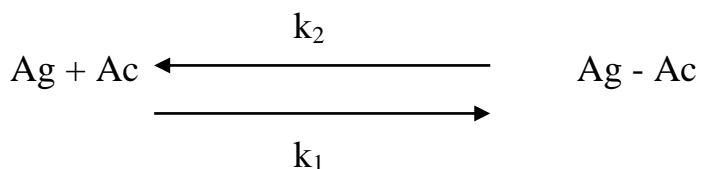
## 1.2. Turbidimétrie (milieu liquide)

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, 5, 23, 26]

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 :

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

Parmi ces méthodes, nous avons les méthodes d'immunofluorescence et immunoenzymatique : l'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorban 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 ou chromatographie de partage, où 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 plastiques. La séparation s'effectue par migration de solutés dans un solvant sur la couche mince ;

- la chromatographie en phase gazeuse (CPG) 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.

- Spectrométrie

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



### **CHAPITRE III :QUALITE DES MEDICAMENTS**

[12, 13, 15, 18, 22, 30]

Le médicament est destiné à protéger la santé d'un individu et d'une collectivité et 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 de tester 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 en tant que concept applicable aux produits pharmaceutiques comme 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 capsules ne doivent pas varier d'un échantillon à l'autre pour un même médicament.

### **1.7. La bio-disponibilité**

Souvent un médicament paraîtra excellent et passera tous les tests analytiques, une fois donné au malade il ne sera pas absorbé correctement dans la circulation

sanguine et n'aura pas de ce fait l'effet thérapeutique attendu : la bio-disponibilité 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 DE VALIDATION ET DEFINITIONS DE QUELQUES PARAMETRES DE VALIDATION [10]**

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 analyste, 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 CV en pourcentage.

Le respect des règles d'assurance qualité des laboratoires oblige à la validation des techniques en 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 commission de validation de techniques de la SFBC avait proposé en 1986 un protocole de validation accompagné de normes d'acceptabilité établies pour une vingtaine d'analystes.

Ce protocole a été largement utilisé et a permis un dialogue fructueux entre les différents partenaires de la biologie médicale : biologistes entre eux, biologistes et industriels, biologistes et cliniciens, biologistes et partenaires administratifs. Il est apparu très vite que le nombre d'analystes décrits dans ce document était insuffisant. C'est pourquoi les initiateurs du premier projet ont souhaité rassembler un groupe de travail, sous l'égide de la SFBC, pour réactualiser et proposer des critères de validation dans un domaine plus étendu. Ce document permet la définition des normes d'acceptabilité (limites de reproductibilité, de justesse et exactitude pour une centaine d'analytes et des niveaux de concentration pertinents choisis pour correspondre le plus souvent à des niveaux de décision médicale différents.

Les paramètres de la validation sont :

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

## **1. LINEARITE OU DOMAINE D'ANALYSE**

Evaluation de la limite haute et basse de la relation linéaire existant entre la concentration de l'analyte observé et la dilution effectuée.

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, répéter l'essai, le cas échéant, dans d'autres conditions de temps.

## 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. Si le nombre de valeur = 30, la valeur de 3 est retenue pour  $k$ .

$$LD = S \times k$$

LD = limite de détection

S = écart-type

K = facteur dépendant du nombre de mesures effectuées

## 3. PRECISIONS

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

Evaluation 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. Il faut calculer les variances de chaque série de mesure, puis la variance intra-série et l'écart-type (S) en utilisant les formules :

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

$$S = \sqrt{V}$$

### 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.

Calculer la moyenne et l'écart-type des valeurs obtenues pour un même spécimen au cours des séries indépendamment effectuées en exploitant les formules :

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

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

$X_i$  = chaque valeur

$n$  = nombre total de valeurs

$S$  = écart-type

$m$  = moyenne

## 5. SPECIFICITE

C'est l'aptitude d'une méthode à mesurer la concentration de l'analyte sans interférence de la part des autres constituants de l'échantillon.

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 ET JUSTESSE

Evaluation 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.



**Remarque**

Toutes ces caractéristiques ne sont pas toujours applicables à toutes les méthodes d'essai ni à tous les produits à analyser.

Dans tous les cas, chacune des caractéristiques de performance applicable à la méthode analytique doit faire l'objet d'une évaluation fondée sur des données expérimentales.



**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 :

- Bureau physico-chimie et pharmaco-technie ;
- Bureau microbiologie ;
- Bureau vaccins 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**

- Autoclave stérilisant
- Balance de précision
- Hotte
- Etuve
- Microscope optique
- Vortex
- Read biotic
- pHmètre
- Flacons de 60 ml, 100 ml, 500 ml
- Pipettes de 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml
- Boîtes de pétri
- Pincés
- Disques
- Cupules
- Anses
- Ecouillons
- Bechers
- Portoirs
- Eprouvettes
- Tubes à essais
- Tubes à hémolyse
- Tubes coniques

## 1.2. Réactifs et milieux de culture

### 1.2.1. *Réactifs*

- Eau distillée
- Méthanol
- Diméthylsulfoxyde (DMSO)
- Diméthylformamide (DMF)
- Tampons

#### ■ Préparation

##### ● *Tampon<sub>4</sub> pH 4,5*

Phosphate monopotassique      1,36 g

##### ● *Tampon<sub>1</sub> pH 6*

Phosphate monopotassique      8 g

Phosphate dipotassique          2 g

##### ● *Tampon<sub>3</sub> pH 8*

Phosphate monopotassique      0,0524 g

Phosphate dipotassique          1,673 g

##### ● *Tampon<sub>10</sub> pH 10,5*

Phosphate dipotassique          3,5 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.

La stérilisation a été effectuée à 121° C pendant 15 minutes.

### 1.2.2. Milieux de culture

#### 1.2.2.1. Antibiotic Medium 1 (AM<sub>1</sub>)

##### •Composition

Peptone pancréatique de caséine	4 g
Peptone bactérienne	6 g
Extrait de levure	3 g
Extrait de viande de bœuf	1,5 g
Glucose	1 g
Agar	1,5 g
Eau	1000 ml
pH	6,6

##### •Préparation

Nous avons mis en suspension 3,05 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée. Ce mélange est porté à ébullition pendant environ 1 minute.

#### 1.2.2.2. AM<sub>2</sub>

##### •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

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

### 1.2.2.3. AM<sub>11</sub>

Il a la même composition que le milieu AM<sub>1</sub> mais son pH final est de 8,3.

### 1.2.2.4. Gélose sabouraud

#### •Composition

Bacto Néopeptone	10 g
Bacto Dextrose	20 g
Bacto Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

#### •Préparation

Nous avons dissous 21 g de poudre de Sabouraud Agar dans 500 ml d'eau distillée.

### 1.2.2.5. Gélose Trypticase-soja

#### •Composition

Peptone pancréatique de caséine	15 g/l
Peptone papaïque de soja	5 g/l
Chlorure de sodium	5 g/l
Gélose	15 g/l

Le pH à 25°C :  $7,3 \pm 0,2$

#### •Préparation

Nous avons dissous 20 g de poudre de Trypticase-soja agar dans 500 ml d'eau distillée.

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

### 1.3. Souches de référence

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCL 29213
- *Candida albicans* ATCC 24433
- *Candida tropicalis*

### 1.4. Antibactériens utilisés

Différentes familles d'antibiotiques ont été utilisées et dans chaque famille, nous avons eu à tester une seule forme (**tableau I**).

**Tableau I : Echantillons à doser**

		<b>DCI</b>	<b>Formes</b>	<b>Doses</b>
<b>ANTIBIOTIQUES</b>	Bétalactamines	Amoxicilline	Gélules	500 mg
	Cyclines	Tétracycline	Gélules	250 mg
	Aminosides	Gentamicine	Injectable	80 mg
	Macrolides	Erythromycine	Comprimés	500 mg
	Sulfamides	Cotrimoxazole	Comprimés	(400 + 80) mg
	Triméthoprim			
<b>ANTIFONGIQUES</b>	Polyènes	Amphotéricine B	Gélules	250 mg
		Nystatine	Comprimés	500.000 UI



## **2. TESTS PREALABLES DE STERILITE ET D'EFFICACITE**

### **2.1. Tests de stérilité**

#### **2.1.1. *Milieux de culture***

Nous avons préparé les milieux de culture aseptiquement, stérilisé puis coulé dans des boîtes de pétri stériles. Après séchage à la température du laboratoire sous la flamme du bec bunsen, nous avons incubé une boîte à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

#### **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 stériles 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 pour les antibiotiques et 48 heures pour les antifongiques.

## **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***

Nous avons mis une colonie de germes dans 1 ml d'eau physiologique et avons comparé le trouble avec le tube de Mac Farland 0,5. La suspension de germe est préparée extemporanément.

#### ***3.2.2. Préparation de la gamme de dilution***

- **Etalon**

$$\text{Masse à peser} = \frac{\text{Concentration } (\mu\text{g / ml}) \times \text{Volume (ml)}}{\text{Titre } (\mu\text{g / mg)}}$$

Nous avons fait des dilutions de la solution mère pour avoir une gamme d'étalonnage.

- **Antibactérien à doser**

Nous avons fait les mêmes dilutions pour avoir une même gamme d'étalon.

### **3.3. Titrage**

Le milieu de culture est régénéré et mis en surfusion entre 45 et 50°C. Le milieu est ensuite coulé en boîtes de Pétri. Après séchage, nous avons ensemencé la suspension de germes par écouvillonnage, déposé les disques stériles à l'aide d'une pince stérile. Ces disques sont chargés avec 15 µl de chaque dilution de la substance de référence et de l'antibactérien à doser.

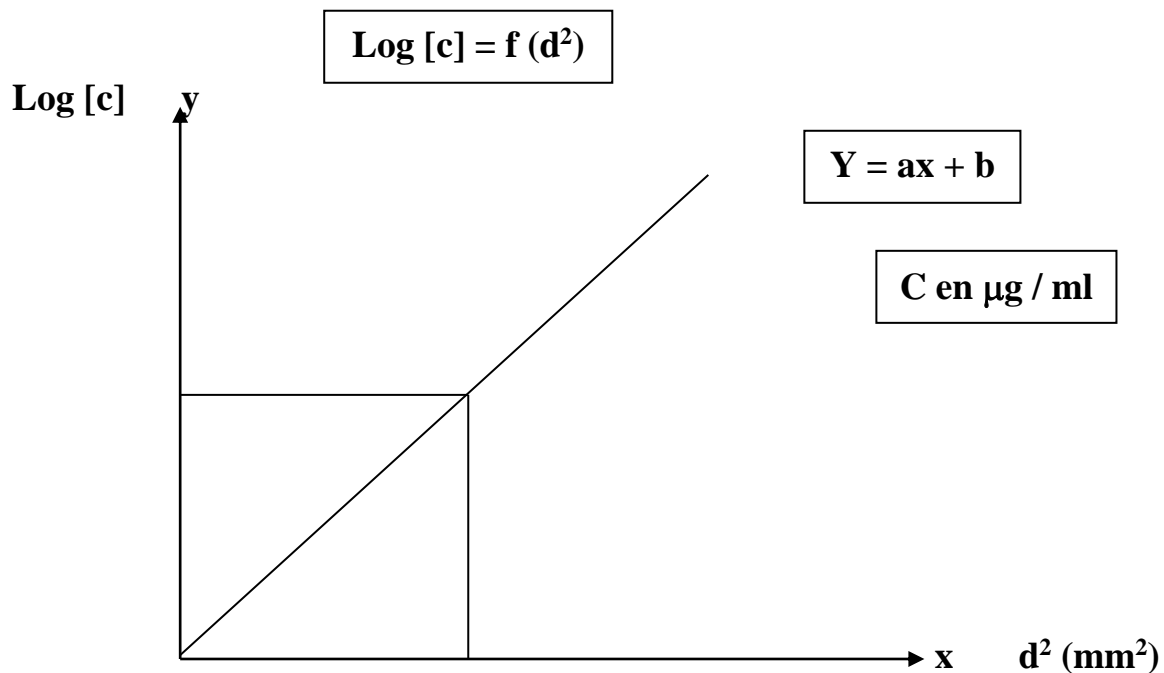
Nous avons laissé diffuser 2 heures à la température ambiante puis incubé à l'étuve à 37°C pendant 24-48 heures.

### **3.4. Expression des résultats**

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

Pour cela, 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 ( $d^2$ )  $\log [c] = f(d^2)$ .



• *Détermination de l'activité*

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

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

**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

## 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 des $\beta$ -lactamines

Amoxicilline

Forme dosée : gélules 500 mg

#### 4.2.1. *Réactifs et milieu de culture*

Souche test : *Escherichia Coli* ATCC 25922

Solvant : Tampon pH 6

Diluant : Eau distillée stérile

Milieu : AM<sub>2</sub>

#### 4.2.2. *Mode opératoire*

Préparation de la gamme de dilution.

- Etalon

$$\text{Masse à peser} = \frac{\text{Concentration } (\mu\text{g} / \text{ml}) \times \text{Volume (ml)}}{\text{Titre } (\mu\text{g} / \text{mg})}$$

$$C = 12800 \mu\text{g/ml}$$

$$V = 5 \text{ ml}$$

$$T = 870 \mu\text{g/mg}$$

$$M = 73,56 \text{ mg}$$

La quantité de substance de référence pesée est dissoute dans 5 ml de solvant.

Nous avons fait des dilutions au 1/10<sup>ème</sup> ; au 1/8<sup>ème</sup> puis 1/2 en 1/2 pour avoir une gamme : [80 - 40 - 20 - 10 - 5]  $\mu\text{g} / \text{ml}$ .

- **Antibiotique à doser**

Nous avons dissous 73,56 mg de poudre d'amoxicilline gélules dans 5 ml de solvant.

Nous avons fait des dilutions au 1/10<sup>ème</sup> ; au 1/8<sup>ème</sup> puis 1/2 en 1/2 pour avoir la même gamme que l'étalon.

#### ***4.2.3. Titrage***

Nous avons régénéré le milieu AM<sub>2</sub> et mis en surfusion entre 45 et 50°C. Le milieu est coulé en boîtes de Pétri. Après séchage, nous avons ensemencé la suspension bactérienne par écouvillonnage, déposé des disques stériles avec une pince stérile.

Les disques déposés sont chargés avec 15 µl de chaque dilution.

Nous avons laissé diffuser 2 heures à la température ambiante puis incubé à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

#### ***4.2.4. Expression des résultats***

- **Traçage de la droite de concordance**

Les diamètres des zones d'inhibition correspondant aux concentrations de la gamme d'étalon.

La droite logarithmique (base 2) de la concentration en fonction du diamètre au carré ( $d^2$ )  $\log [c] = f(d^2)$  a été établie.

### **4.3. Dosage des cyclines**

Tétracycline

Forme dosée : gélules 250 mg

#### ***4.3.1. Réactifs***

Souche test : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Solvant : tampon<sub>4</sub> pH 4,5

Diluant : tampon<sub>4</sub> pH 4,5

Milieu : AM<sub>1</sub>

#### ***4.3.2. Mode opératoire***

Préparation de la gamme de dilution

##### **• Etalon**

$$C = 1600 \mu\text{g} / \text{ml}$$

$$T = 1009 \mu\text{g} / \text{mg}$$

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

$$M = 15,86 \text{ mg}$$

Nous avons dissous 15,86 mg de poudre de tétracycline référence dans 10 ml de solvant.

Nous avons fait des dilutions au  $1/10^{\text{ème}}$  puis  $1/2$  en  $1/2$  pour avoir la gamme : [80 - 40 - 20 - 10 - 5]  $\mu\text{g} / \text{ml}$ .

##### **• Antibiotique à doser**

Nous avons dissous 15,86 mg de poudre de tétracycline gélules dans 10 ml de solvant. Nous avons fait des dilutions au  $1/10^{\text{ème}}$  puis  $1/2$  en  $1/2$  pour avoir la même gamme que l'étalon.

#### ***4.3.3. Titrage***

Nous avons régénéré le milieu AM<sub>1</sub> et laissé en surfusion entre 45 et 50°C puis coulé en boîtes de Pétri. Après ensemencement de la suspension de germes, les disques sont déposés puis chargés avec 15 ml de chaque dilution de la gamme.

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

#### 4.3.4. Expression des résultats

Traçage de la droite de concordance

Nous avons mesuré les diamètres des zones d'inhibition correspondant aux concentrations de la gamme de dilution. Nous avons ensuite établi la droite logarithmique (base 2) de la concentration en fonction du diamètre au carré ( $d^2$ )  $\log [c] = f(d^2)$ .

#### 4.4. Dosages des aminosides : Gentamicine

Forme : sulfate de gentamicine injectable 80 mg / 2 ml (solution).

##### 4.4.1. Réactifs

Souche test : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Solvant : tampon<sub>3</sub> pH 8

Diluant : Tampon<sub>3</sub> pH 8

Milieu : AM<sub>11</sub>

##### 4.4.2. Mode opératoire

Préparation de la gamme de dilution

##### • Etalon

$C = 1600 \mu\text{g} / \text{ml}$

$T = 16500 \mu\text{g} / \text{ml}$

$V = 10 \text{ ml}$

$M = 0,97 \text{ mg}$

Nous avons dissous 0,97 mg de poudre de gentamicine référence dans 10 ml de solvant, ensuite fait des dilutions au  $1/10^{\text{ème}}$  puis  $1/2$  en  $1/2$  pour avoir la gamme :  $[80 - 40 - 20 - 10 - 5] \mu\text{g} / \text{ml}$ .

### • Antibiotique à doser

Après mélange de 2 ml de gentamicine 80 mg dans 8 ml de solvant, nous avons fait des dilutions au  $1/10^{\text{ème}}$  puis  $1/2$  en  $1/2$  pour avoir la même gamme que l'étalon.

#### 4.4.3. *Titration*

Le milieu AM<sub>11</sub> est régénéré et laissé en surfusion entre 45 et 50°C. Il est ensuite coulé en boîtes de pétri puis séché. Après ensemencement de la suspension de germes, les disques sont déposés puis chargés avec 15 ml 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.

#### 4.4.4. *Expression des résultats*

##### • **Traçage de la droite de concordance**

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 ( $d^2$ )  $\log [c] = f (d^2)$ .

### 4.5. Dosage des macrolides : Erythromycine

Forme dosée : comprimés 500 mg

#### 4.5.1. *Réactifs*

Souche test : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Solvant : Méthanol

Diluant : Tampon<sub>3</sub> pH 8

Milieu : AM<sub>1</sub>

#### 4.5.2. **Mode opératoire**

Préparation de la gamme de dilution.



• **Etalon**

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

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

$$T = 952 \mu\text{g} / \text{ml}$$

$$M = 10,5 \text{ mg}$$

Nous avons dissous 10,5 mg de poudre d'érythromycine référence dans 10 ml de solvant. Nous avons fait des dilutions au  $1/10^{\text{ème}}$  puis  $1/2$  en  $1/2$  pour avoir la gamme : [50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,125]  $\mu\text{g} / \text{ml}$ .

• **Antibiotique à doser**

Nous avons dissous 10,5 mg de poudre d'érythromycine comprimé dans 10 ml de solvant. Nous avons fait des dilutions au  $1/10^{\text{ème}}$  puis  $1/2$  en  $1/2$  pour avoir la même gamme que l'étalon.

**4.5.3. Titrage**

Nous avons régénéré le milieu  $\text{AM}_1$  et mis en surfusion entre 45-50°C. Le milieu est coulé en boîtes de Pétri puis séché.

Les disques sont déposés après ensemencement de la suspension bactérienne. Ils sont ensuite chargés avec 15 ml de chaque dilution. 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 ( $d^2$ )  $\log [c] = f (d^2)$  a été établie après avoir mesuré les diamètres des zones d'inhibition correspondant aux concentrations de la gamme de dilution.

#### **4.6. Dosage des sulfamides et Triméthoprime : Cotrimoxazole**

Forme comprimés 400 + 800 mg (Sulfaméthoxazole + Triméthoprime)

##### **4.6.1. Réactifs**

Souche test : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Diluant : Eau distillée

Milieu : AM<sub>2</sub>

**N.B.** : le solvant diffère selon qu'il s'agit de la substance de référence ou de la spécialité :

- Solvant de l'étalon :
  - pour triméthoprime, nous avons utilisé HCl 0,05 N
  - pour sulfaméthoxazole, nous avons utilisé NaOH 0,1 N
- Solvant de l'antibiotique à doser : Méthanol

##### **4.6.2. Mode opératoire**

- Préparation de la gamme de dilution

##### **Etalon**

$$\left. \begin{array}{l} C_1 = 76\,000 \mu\text{g} / \text{ml} \text{ (sulfaméthoxazole)} \\ C_2 = 15\,200 \mu\text{g} / \text{ml} \text{ (Triméthoprime)} \end{array} \right\} C = 91200 \mu\text{g} / \text{ml}$$

$$V = V_1 + V_2 = 2 \text{ ml}$$

$$\left. \begin{array}{l} m_1 = 76 \text{ mg} \\ m_2 = 15,2 \text{ mg} \end{array} \right\} m = 91,2 \text{ mg}$$

Nous avons fait des dilutions au  $1/10^{\text{ème}}$  puis  $1/2$  en  $1/2$  pour avoir la gamme [3800/760 ; 1900/380 ; 950/190 ; 475/95 ; 237,75/47,5]  $\mu\text{g/ml}$ .

#### • Antibiotique à doser

Après dissolution de 91,2 mg dans 2 ml de solvant (méthanol), nous avons fait des dilutions au  $1/10^{\text{ème}}$  puis  $1/2$  en  $1/2$  pour avoir la même gamme que l'étalon.

#### **4.6.3. Titrage**

Le milieu  $\text{AM}_2$  est régénéré, laissé en surfusion entre  $45-50^\circ\text{C}$ , coulé en boîtes de pétri puis séché. Après ensemencement de la suspension bactérienne, les disques sont déposés, ensuite chargés avec 15 ml de chaque dilution. Une phase de pré-diffusion est nécessaire avant l'incubation.

#### **4.6.4. Expression des résultats**

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

Nous avons ensuite établi la droite logarithmique (base 2) de la concentration en fonction du diamètre au carré ( $d^2$ )  $\log [c] = f(d^2)$ .

### **4.7. Dosage des antifongiques**

#### **4.7.1. Amphotéricine B**

##### **4.7.1.1. Réactifs**

Souches test : *Candida albicans* ATCC 24433

Solvant : diméthylsulfoxyde (DMSO)

Diluant : Tampon 10 : 0,2 M ; pH = 10,5

Milieu de culture :  $\text{AM}_2$ .

#### 4.7.1.2. Mode opératoire

- **Préparation de la gamme de dilution**

##### Etalon

$$C = 1600 \mu\text{g} / \text{ml}$$

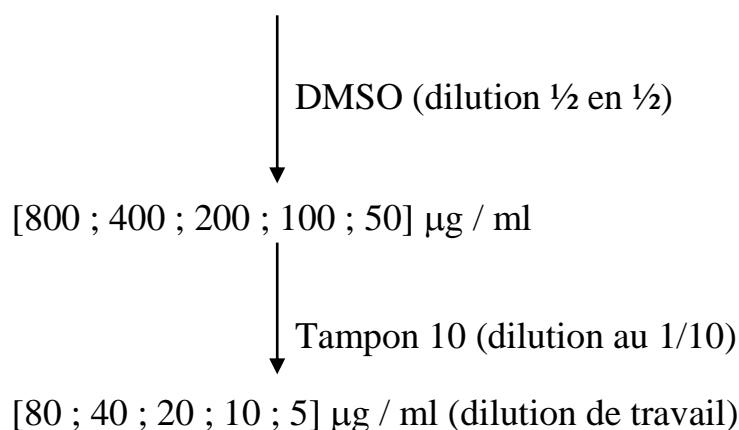
$$V = 10 \text{ ml}$$

$$\text{Titre} = 1 \mu\text{g} / \text{ml}$$

$$M = 16 \text{ mg}$$

Nous avons dissous 16 mg de poudre d'amphotéricine B référence dans 10 ml de solvant. Ensuite, nous avons fait les dilutions suivantes :

Amphotéricine B 1600  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (solution mère)



- **Antifongique à doser :**

Nous avons procédé de la même manière avec la poudre d'amphotéricine B gélules.

#### 4.7.1.3. *Titration*

Nous avons régénéré le milieu AM<sub>2</sub> et laissé en surfusion entre 45-50°C puis coulé en boîtes de pétri.

Après séchage du milieu, nous avonsensemencé la suspension de germes et déposé les disques.

Ces disques sont chargés avec 15 ml de chaque dilution de travail. L'incubation a été faite à 37°C pendant 48 heures après une phase de pré-diffusion de 2 heures.

#### ***4.7.1.4. Expression des résultats***

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

Nous avons ensuite établi la droite logarithmique (base 2) de la concentration en fonction du diamètre au carré ( $d^2$ )  $\log [c] = f (d^2)$ .

#### **4.7.2. *Nystatine***

##### **4.7.2.1. Réactifs**

- Souches test : *Candida albicans* ATCC 24433  
Solvant : diméthyl formamide (DMF)  
Diluant : Tampon pH 6  
Milieu de culture : AM<sub>2</sub>

##### **4.7.2.2. Mode opératoire**

- Préparation de la gamme de dilution

- **Etalon**

$$C = 5000 \mu\text{g} / \text{ml}$$

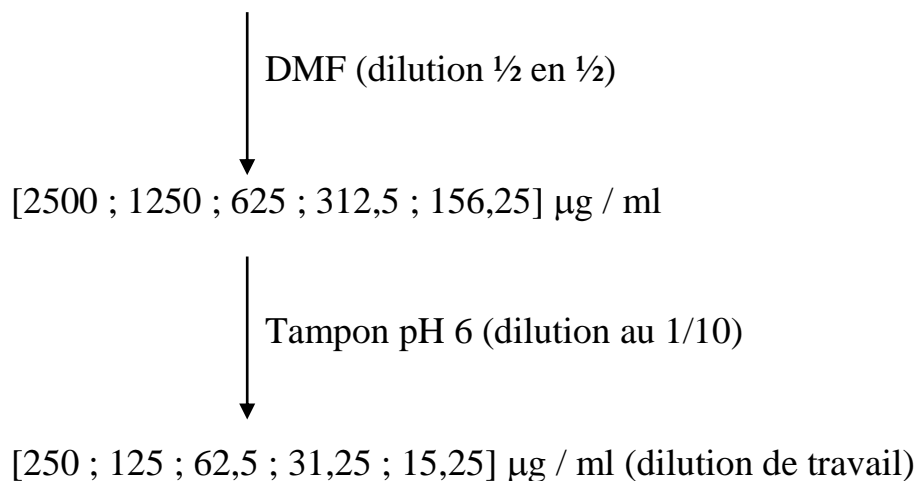
$$V = 1 \text{ ml}$$

$$\text{Titre} : 1000 \mu\text{g} / \text{ml}$$

$$M = 5 \text{ mg.}$$

Nous avons dissous 5 mg de poudre de nystatine référence dans 1 ml de solvant et avons fait des dilutions selon le schéma ci-dessous :

Nystatine 5000  $\mu\text{g}$  / ml (solution mère)



#### • Antifongique à doser

Nous avons procédé de la même manière avec la poudre de nystatine 500.000 UI comprimés.

#### 4.7.2.3. Titrage

Nous avons régénéré le milieu AM<sub>2</sub> et mis en surfusion entre 45-50°C puis coulé en boîtes de pétri.

Après séchage et ensemencement des boîtes, nous avons déposé les disques stériles qui sont ensuite chargés avec 15 ml de chaque dilution.

L'incubation a été faite à 37°C pendant 48 heures après une phase de pré-diffusion de 2 heures.

#### 4.7.2.4. Expression des résultats

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

Nous avons ensuite établi la droite logarithmique (base 2) de la concentration en fonction du diamètre au carré ( $d^2$ )  $\log [c] = f(d^2)$ .

## 5. STANDARDISATION

La fiabilité des résultats est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés.

Parmi les principales recommandations, on peut citer :

- le milieu de culture doit permettre la croissance de nombreuses bactéries et ne doit pas contenir d'inhibiteurs des antimicrobiens ;

- le pH influence l'activité de nombreux antimicrobiens (les aminosides et les macrolides sont plus actifs en milieu acide) ;

- pour les méthodes de diffusion, la source d'antimicrobiens est en fait constituée par le disque et le cylindre de la gélose sous-jacente. L'épaisseur de la gélose va donc conditionner la concentration de la source d'antimicrobien et elle doit être de 4 mm.

- la densité de l'inoculum bactérien est un élément primordial et elle doit être ajustée à l'aide d'un photomètre ou par comparaison avec un étalon d'opacité (échelle de Mc Farland) ;

- une phase de pré-diffusion des antimicrobiens peut conduire à l'obtention de zones d'inhibition plus importantes ;

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

## 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 étaient stériles.

##### 1.1.2. *Tampons*

Même constat après 24 heures d'incubation, les tampons étaient stériles.

#### 1.2. Tests d'efficacité

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

### 2. RESULTATS DES ESSAIS PROPREMENT DITS

Expression des résultats : traçage de la droite de concordance :

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

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

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

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

$r$  = 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 calculer la droite de concordance



## 2.1. Dosage des antibiotiques

### 2.1.1. Détermination de l'activité de l'amoxicilline

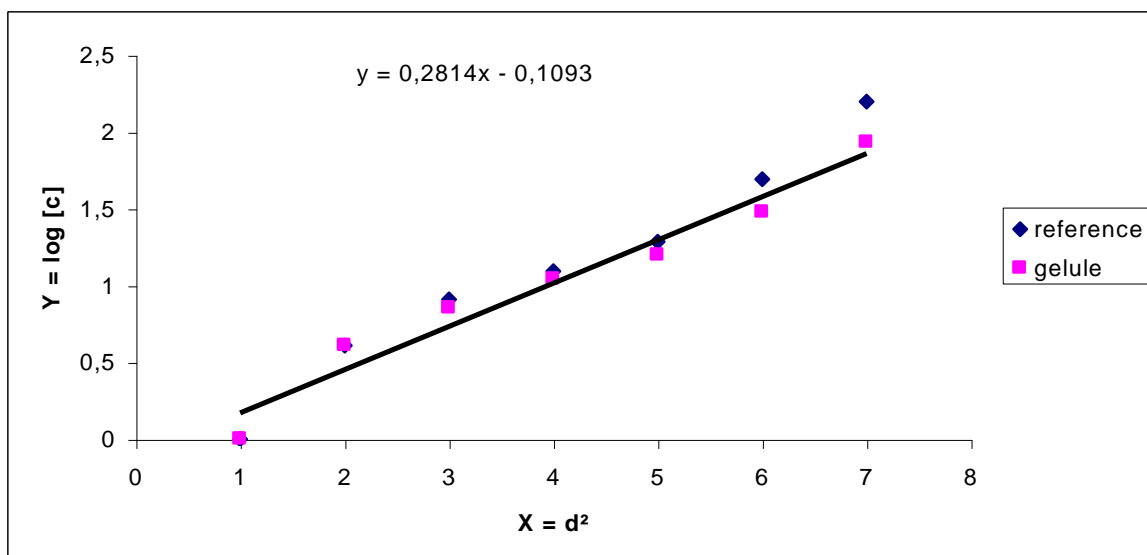
**Tableau II : Résultats du dosage de l'amoxicilline**

<b>Concentration c (µg/ml)</b>	80	40	20	10	5	
<b>Diamètres d'inhibition (mm)</b>	<b>Référence</b>	23	19	15	12	10
	<b>Comprimé</b>	21	17	14	12	9
<b>x = d<sup>2</sup></b>	441	289	196	144	81	
<b>y = log [c]</b>	1,9	1,6	1,3	1	0,7	
<b>x y</b>	837,9	462,4	254,8	144	56,7	
<b>x<sup>2</sup></b>	194481	83521	38416	20736	6561	
<b>y<sup>2</sup></b>	3,61	2,56	1,69	1	0,49	
<b>a</b>	<b>0,2814</b>					
<b>b</b>	- 0,1093					
<b>r</b>	<b>0,97</b>					
<b>DR</b>	<b>462,03</b>					
<b>A %</b>	<b>92,41</b>					

Nous avons noté une ressemblance entre les diamètres d'inhibition de la référence et ceux de la forme gélule de l'amoxicilline. Avec ces valeurs, nous avons constaté une bonne distribution des données au niveau de la figure 5.

Nous avons également calculé la pente a de l'équation  $y = ax + b$  avec  $y = \log [c]$  et  $x = d^2$  ; la valeur de a est presque nulle, ce qui permet de dire que l'erreur est faible.

La valeur du coefficient de corrélation reflète une bonne linéarité entre les deux variables x et y.



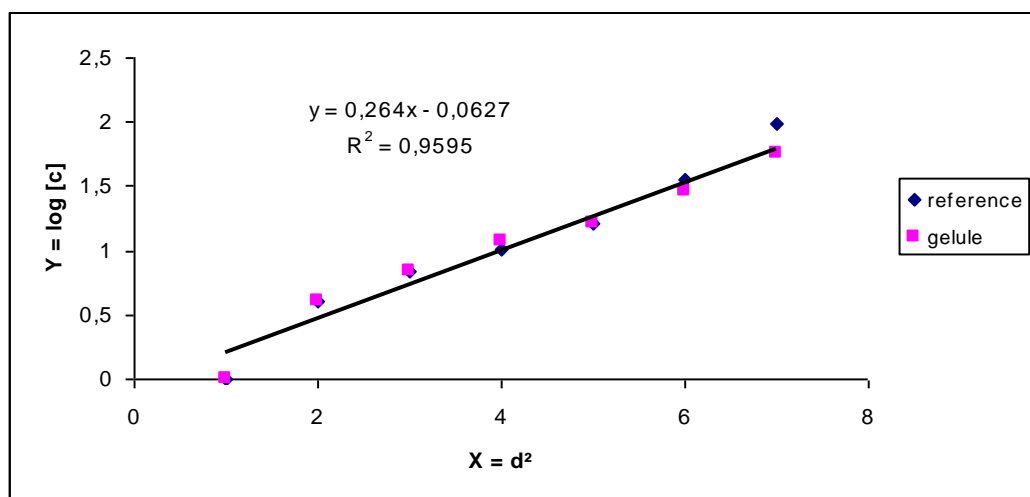
**Figure 5 : Droite de concordance de l'amoxicilline**

### 2.1.2. Détermination de l'activité de la tétracycline

**Tableau III : Résultats du dosage de la tétracycline**

<b>Concentration c (µg/ml)</b>		80	40	20	10	5
<b>Diamètres d'inhibition (mm)</b>	<b>Référence</b>	24	20	16	13	10
	<b>Comprimé</b>	22	19	16	14	10
<b>x = d<sup>2</sup></b>		576	400	256	169	100
<b>y = log [c]</b>		1,9	1,6	1,3	1	0,7
<b>x y</b>		1094,4	640	332,8	169	70
<b>x<sup>2</sup></b>		331776	160000	65536	28561	10000
<b>y<sup>2</sup></b>		3,61	2,56	1,69	1	0,49
<b>a</b>		<b>0,264</b>				
<b>b</b>		<b>- 0,0627</b>				
<b>r</b>		<b>0,98</b>				
<b>DR</b>		<b>243,98</b>				
<b>A %</b>		<b>97,59</b>				

Grâce aux valeurs de  $x$  et de  $y$ , nous avons pu constater une bonne distribution des données (*figure 6*) de la référence et de la forme comprimé de la tétracycline. Le coefficient de corrélation est situé dans les limites de la valeur standard.



**Figure 6 : Droite de concordance de la tétracycline**

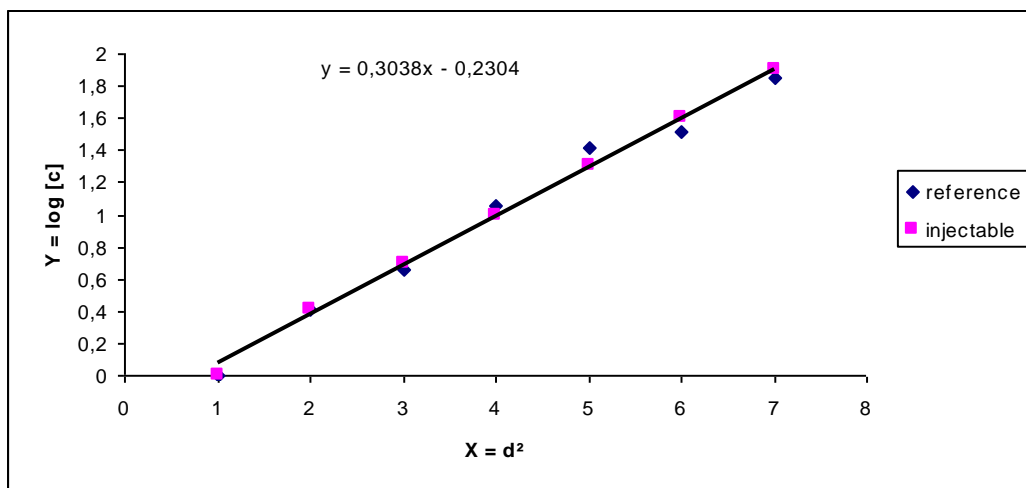
### 2.1.3. Détermination de l'activité de la Gentamicine

**Tableau IV : Résultats du dosage de la gentamicine**

Concentration $c$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		80	40	20	10	5
Diamètres d'inhibition (mm)	Référence	24	21	20	16	10
	Comprimé	20	17	14	11	9
$x = d^2$		576	441	400	256	100
$y = \log [c]$		1,9	1,6	1,3	1	0,7
$X y$		1094,4	705,6	520	256	70
$X^2$		331776	194481	160000	65536	10000
$Y^2$		3,61	2,56	1,69	1	0,49
<b>a</b>		<b>0,3038</b>				
<b>b</b>		<b>- 0,2304</b>				
<b>r</b>		<b>0,98</b>				
<b>DR</b>		<b>62,42</b>				
<b>A %</b>		<b>78,03</b>				

Les valeurs de  $x$  et de  $y$  sont presque confondues, ce qui nous a permis de tracer la droite la plus représentative (*figure 7*).

Les données de la référence et de la forme injectable sont presque confondues. Le coefficient de corrélation est compris entre -1 et 1.



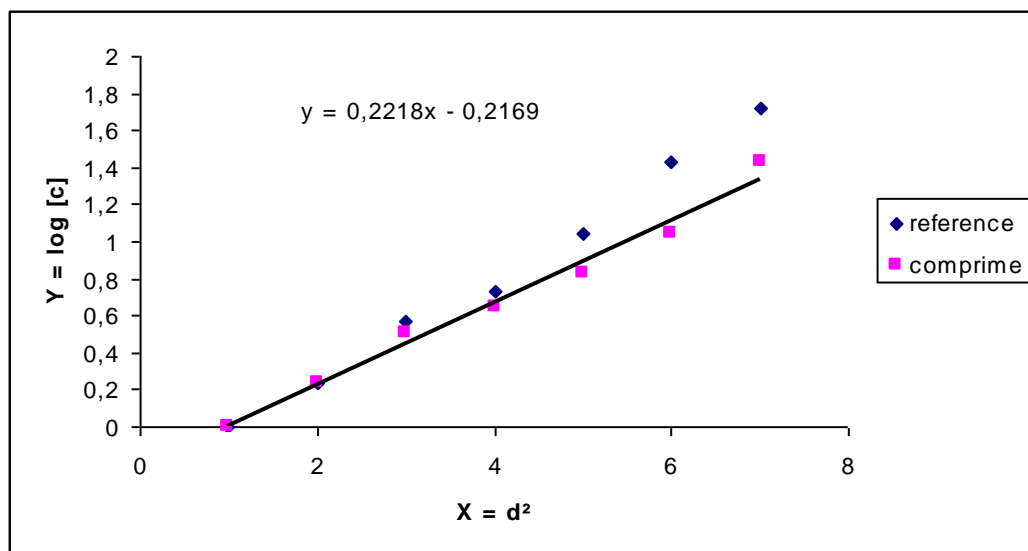
**Figure 7 : Droite de concordance de la gentamicine**

#### 2.1.4. Détermination de l'activité de l'érythromycine

**Tableau V : Résultats du dosage de l'érythromycine**

<b>Concentration c (µg/ml)</b>	50	25	12,5	6,5	3,125	
<b>Diamètres d'inhibition (mm)</b>	<b>Référence</b>	19	17	14	11	9
	<b>Comprimé</b>	17	14	12	10	8
<b>x = d<sup>2</sup></b>	361	289	196	121	81	
<b>y = log [c]</b>	1,7	1,4	1,1	0,8	0,5	
<b>x y</b>	613,7	404,6	215,6	96,8	40,5	
<b>x<sup>2</sup></b>	130.321	83.521	38.416	14.641	6.561	
<b>y<sup>2</sup></b>	2,89	1,96	1,21	0,64	0,25	
<b>a</b>	<b>0,2218</b>					
<b>b</b>	<b>- 0,2169</b>					
<b>r</b>	<b>0,99</b>					
<b>DR</b>	<b>435,71</b>					
<b>A %</b>	<b>87,14</b>					

Nous constatons une bonne distribution des différentes données de la référence et de la forme comprimé (*figure 8*). La valeur du coefficient de corrélation traduit la fiabilité de la droite.



**Figure 8 : Droite de concordance de l'érythromycine**

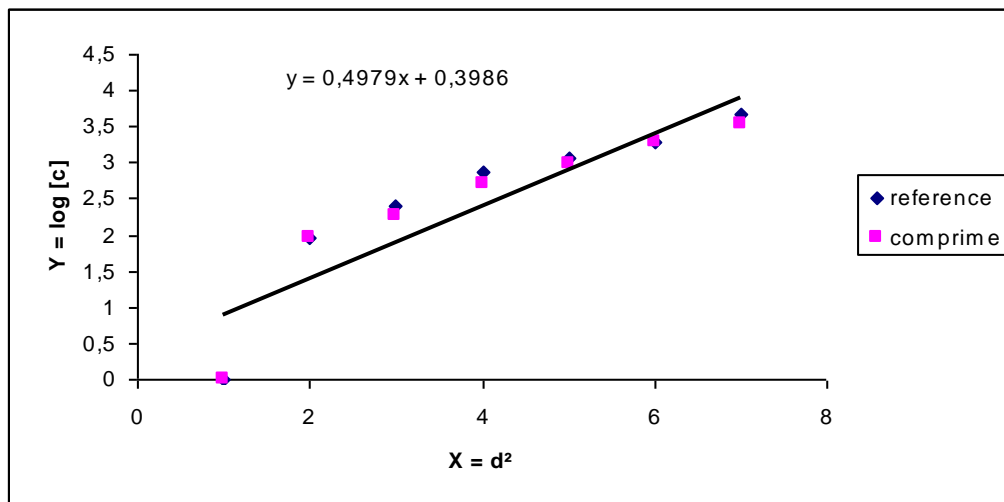
### 2.1.5. Détermination de l'activité du cotrimoxazole

**Tableau VI : Résultats du dosage du cotrimoxazole**

<b>Concentration c (µg/ml)</b>		4560	2280	1140	570	285
<b>Diamètres d'inhibition (mm)</b>	<b>Référence</b>	26	23	21	19	9
	<b>Comprimé</b>	25	23	20	17	13
<b>x = d<sup>2</sup></b>		676	529	441	361	169
<b>y = log [c]</b>		3,66	3,36	3,06	2,75	2,45
<b>x y</b>		2474,16	1777,44	1349,46	992,75	414,05
<b>x<sup>2</sup></b>		456.976	279.841	194.481	130.321	28.561
<b>y<sup>2</sup></b>		13,4	11,3	9,4	7,6	6
<b>a</b>		<b>0,4979</b>				
<b>b</b>		0,3986				
<b>r</b>		<b>0,001</b>				
<b>DR</b>		<b>480</b>				
<b>A %</b>		<b>100</b>				

Grâce au diagramme de dispersion de la référence et de la forme comprimé, nous avons pu tracer la droite la plus représentative (*figure 9*).

La valeur du coefficient de corrélation est faible.



**Figure 9 : Courbe de concordance du cotrimoxazole**

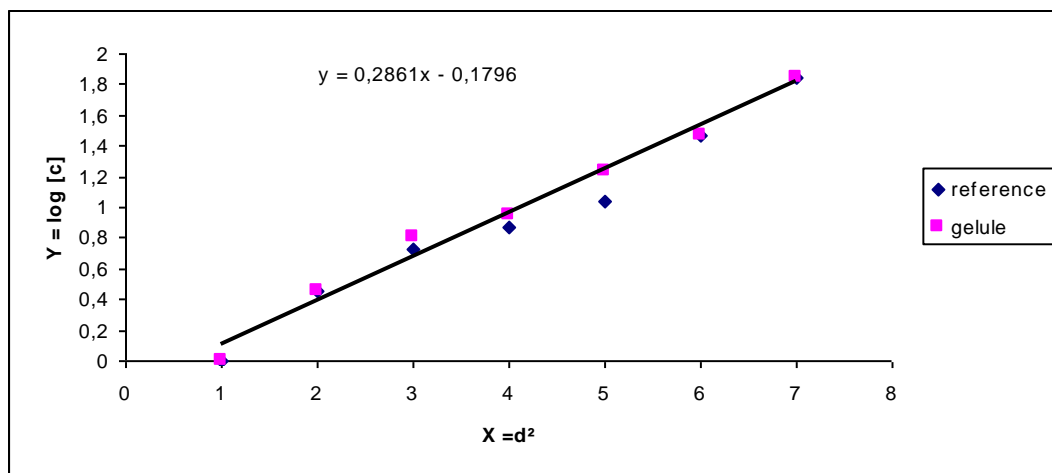
## 2.2. Dosage des antifongiques

### 2.2.1. Détermination de l'activité de l'amphotéricine B

**Tableau VII : Résultats du dosage de l'amphotéricine B**

<b>Concentration c (µg/ml)</b>	80	40	20	10	5	
<b>Diamètres d'inhibition (mm)</b>	<b>Référence</b>	20	17	13	11	9
	<b>Gélule</b>	17	15	12	10	8
<b>x = d²</b>		400	289	169	121	81
		289	225	144	100	64
<b>y = log [c]</b>	1,9	1,6	1,3	1	0,7	
<b>x y</b>	760	462,4	219,7	121	56,7	
<b>x²</b>	160.000	83.521	28.561	14.641	6.561	
<b>y²</b>	3,61	2,56	1,69	1	0,49	
<b>a</b>	<b>0,2861</b>					
<b>b</b>	- 0,1796					
<b>r</b>	<b>0,97</b>					
<b>DR</b>	<b>221,43</b>					
<b>A %</b>	<b>88,57</b>					

Grâce au diagramme de dispersion de la référence et de la forme gélule, nous avons pu tracer la droite la plus représentative (*figure 10*). La valeur du coefficient de corrélation est près de 1 dont nous avons une relation linéaire entre les deux variables x et y.



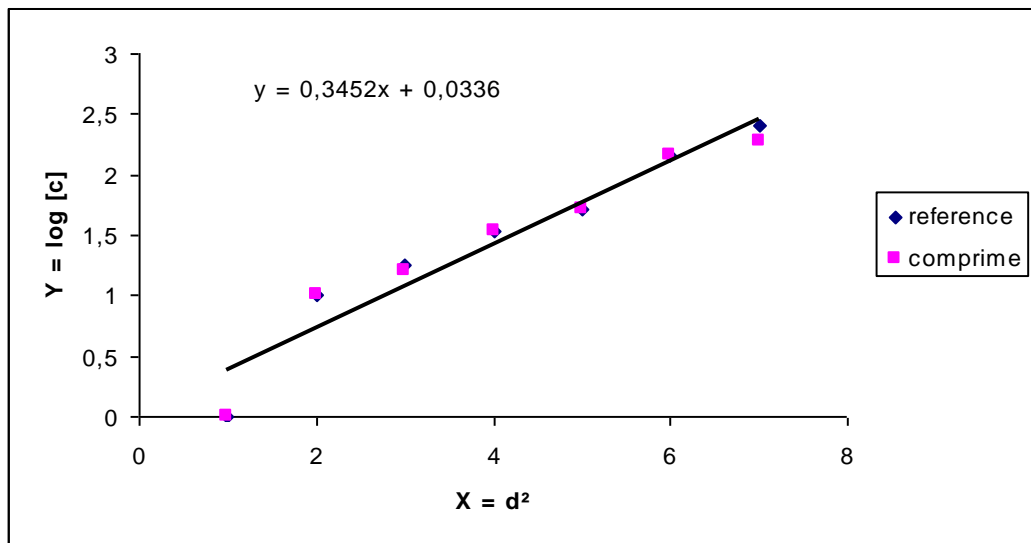
**Figure 10 : Droite de concordance de l'amphotéricine B**

### 2.2.2. Détermination de l'activité de la nystatine

**Tableau VIII : Résultats du dosage de la nystatine**

<b>Concentration c (µg/ml)</b>	250	125	62,5	31,25	15,62	
<b>Diamètres d'inhibition (mm)</b>	<b>Référence</b>	21	19	15	13	9
	<b>Comprimé</b>	20	19	15	13	8
<b>x = d²</b>	441	361	225	169	81	
<b>y = log [c]</b>	2,4	2,1	1,8	1,5	1,2	
<b>x y</b>	1058,4	758,1	405	253,5	97,2	
<b>x²</b>	194.481	130.321	50.625	28.561	6.561	
<b>y²</b>	5,76	4,41	3,24	2,25	1,44	
<b>a</b>	<b>0,3452</b>					
<b>b</b>	0,0336					
<b>r</b>	<b>0,99</b>					
<b>DR</b>	<b>487.012,99</b>					
<b>A %</b>	<b>97,40</b>					

Les différentes données de la référence et de la forme comprimé sont confondues (*figure 11*).



**Figure 11** : Droite de concordance de la nystatine

### 3. RESULTATS DE LA VALIDATION : EXPRESSION DES RESULTATS

- Moyenne des groupes

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

- Variance de répétition à l'intérieur du groupe

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

L'écart-type à l'intérieur du groupe est donné par  $S_i$



- **Variance de répétabilité**

$$\mathbf{Sr}^2 = \frac{\sum_{j=1}^k s_j^2}{K}$$

G<sub>1</sub> : groupe 1

G<sub>2</sub> : groupe 2

G<sub>3</sub> : groupe 3

**Tableau IX : Résultats du calcul des paramètres de validation de l'amoxicilline**

Concentration µg/ml Statistiques	80			40			20		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
<b>Essai 1</b>	20	18	19	17	18	18	15	14	14
<b>Essai 2</b>	19	17	18	19	18	19	14	16	14
<b>Essai 3</b>	20	19	19	17	16	17	16	14	15
<b>m<sub>j</sub></b>	19,67	18	18,67	17,67	17,33	18	15	14,67	14,33
<b>S<sub>j</sub><sup>2</sup></b>	0,00005	0	0,00005	0,22	0,00005	0	0	0,00005	0,00005
<b>S</b>	0,007	0	0,007	0,47	0,007	0	0	0,007	0,007
<b>CV %</b>	<b>0,03</b>	0	0,03	<b>2,66</b>	0,04	0	0	0,047	<b>0,048</b>
<b>S<sub>r</sub><sup>2</sup></b>	0,00003			0,073			0,00003		

Les variances de répétabilité sont nulles aux différentes concentrations (80, 40, 20) µg/ml.

Les coefficients de variation à l'intérieur de chaque groupe sont < 15 %.

**Tableau X : Résultats du calcul des paramètres de validation de la tétracycline**

Concentration µg/ml Statistiques	80			40			20		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
<b>Essai 1</b>	23	20	19	18	16	16	14	15	14
<b>Essai 2</b>	21	20	19	19	18	18	15	15	16
<b>Essai 3</b>	21	22	20	17	16	18	14	13	15
<b>m<sub>j</sub></b>	21,67	20,67	19,33	18	16,67	17,33	14,33	14,33	15
<b>S<sub>j</sub><sup>2</sup></b>	0,00005	0,00005	0,00005	0	0,00005	0,00005	0,00005	0,00005	0
<b>S<sub>j</sub></b>	0,007	0,007	0,007	0	0,007	0,007	0,007	0,007	0
<b>CV %</b>	0,032	<b>0,033</b>	0,036	0	<b>0,042</b>	0,04	0,05	<b>0,05</b>	0
<b>S<sub>F</sub><sup>2</sup></b>	0,00005			0,000033			0,000033		

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

**Tableau XI : Résultats du calcul des paramètres de validation de la gentamicine**

Concentration µg/ml Statistiques	80			40			20		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
<b>Essai 1</b>	20	21	21	18	17	16	14	12	11
<b>Essai 2</b>	22	21	21	17	16	17	11	12	13
<b>Essai 3</b>	20	21	22	16	15	16	10	12	11
<b>m<sub>j</sub></b>	20,67	21	21,33	17	16	16,33	11,67	12	11,67
<b>S<sub>j</sub><sup>2</sup></b>	0,007	0	0,007	0	0	0,007	0,007	0	0,007
<b>S<sub>j</sub></b>	0,007	0	0,007	0	0	0,007	0,007	0	0,007
<b>CV %</b>	<b>0,034</b>	0	0,033	0	0	<b>0,043</b>	0,06	0	<b>0,06</b>
<b>S<sub>r</sub><sup>2</sup></b>	0,000033			0,000016			0,000033		

Les essais de répétabilité ont été satisfaisants, vu les valeurs des coefficients de variation.

**Tableau XII : Résultats du calcul des paramètres de validation de l'érythromycine**

Concentration µg/ml Statistiques	50			25			12,5		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
<b>Essai 1</b>	14	16	13	11	10	10	8	9	8
<b>Essai 2</b>	17	14	15	12	11	11	9	9	9
<b>Essai 3</b>	14	15	16	11	12	10	7	8	8
<b>m<sub>j</sub></b>	15	15	14,67	11,33	11	10,33	8	8,67	8,33
<b>S<sub>j</sub><sup>2</sup></b>	0	0	0,00005	0,00005	0	0,00005	0	0,00005	0,00005
<b>S<sub>j</sub></b>	0	0	0,007	0,007	0	0,007	0	0,007	0,007
<b>CV %</b>	0	0	<b>0,047</b>	0,012	0	<b>0,07</b>	0	0,081	<b>0,084</b>
<b>S<sub>r</sub><sup>2</sup></b>	0,000016			0,000033			0,000033		

Aux différentes concentrations (50, 25, 12,5) µg/ml, les variances de répétabilité ont été trouvées normales.

**Tableau XIII : Résultats du calcul des paramètres de validation de du cotrimoxazole**

Concentration µg/ml Statistiques	4560			2280			1140		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
<b>Essai 1</b>	25	26	25	20	21	20	18	16	17
<b>Essai 2</b>	25	25	25	21	22	20	16	16	16
<b>Essai 3</b>	25	26	25	20	20	21	16	17	17
<b>m<sub>j</sub></b>	25	25,67	25	20,33	21	20,33	16,67	16,33	16,67
<b>S<sub>j</sub><sup>2</sup></b>	0	0,00005	0	0,00005	0	0,00005	0,00005	0,00005	0,00005
<b>S<sub>j</sub></b>	0	0,007	0	0,007	0	0,007	0,007	0,007	0,007
<b>CV %</b>	0	<b>0,033</b>	0	<b>0,034</b>	0	<b>0,034</b>	0,042	0,043	<b>0,042</b>
<b>S<sub>r</sub><sup>2</sup></b>	0,000016			0,000033			0,00005		

La variance de répétition à l'intérieur de chaque groupe d'essai est nulle. Les coefficients de variation sont inférieurs à la valeur standard (**Tableau XII**).

**Tableau XIV : Résultats du calcul des paramètres de validation de l'amphotéricine B**

Concentration µg/ml Statistiques	80			40			20		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
<b>Essai 1</b>	20	17	17	12	15	13	10	11	11
<b>Essai 2</b>	17	16	17	15	12	15	11	9	10
<b>Essai 3</b>	17	16	16	12	12	12	9	8	10
<b>m<sub>j</sub></b>	18	16,33	16,67	13	13	13,33	10	9,33	10,33
<b>S<sub>j</sub><sup>2</sup></b>	0	0,00005	0,00005	0	0	0,00005	0	0,00005	0,00005
<b>S<sub>j</sub></b>	0	0,007	0,007	0	0	0,007	0	0,007	0,007
<b>CV %</b>	0	<b>0,043</b>	0,042	0	0	<b>0,052</b>	0	<b>0,075</b>	0,068
<b>S<sub>r</sub><sup>2</sup></b>	0,000033			0,000016			0,000033		

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

**Tableau XV : Résultats du calcul des paramètres de validation de la nystatine**

Concentration µg/ml Statistiques	250			125			62,5		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
<b>Essai 1</b>	19	20	19	15	14	14	9	10	9
<b>Essai 2</b>	20	21	20	15	15	13	8	9	9
<b>Essai 3</b>	19	18	18	14	13	14	8	8	8
<b>m<sub>j</sub></b>	19,33	19,67	19	14,67	14	13,67	8,33	9	8,67
<b>S<sub>j</sub><sup>2</sup></b>	0,00005	0,00005	0	0,00005	0	0,00005	0,00005	0	0,00005
<b>S<sub>j</sub></b>	0,007	0,007	0	0,007	0	0,007	0,007	0	0,007
<b>CV %</b>	<b>0,036</b>	0,035	0	0,047	0	<b>0,051</b>	0,084	0	<b>0,081</b>
<b>S<sub>r</sub><sup>2</sup></b>	0,000033			0,000033			0,000033		

La variance de répétabilité est négligeable aux différentes concentrations (250, 125, 62,5) µg/ml.



## **CHAPITRE IV : DISCUSSION**

### **1. CHOIX DE LA METHODE DE DOSAGE**

Le principe de dosage microbiologique est le même quel que soit l'antibiotique à doser, mais la méthodologie varie d'une substance à une autre. En effet, les conditions optimales de dosage dépendent des caractéristiques de l'antibiotique et sont influencées par divers facteurs tels :

- **Le milieu de culture** : le choix du milieu utilisé pour le dosage microbiologique est primordial pour la qualité du dosage. La composition et le pH du milieu de culture interfèrent avec l'activité de l'antifongique. La diffusion du médicament est dépendante de la croissance de la souche de référence. Chaque famille d'antifongique possède un pH optimum. Le pH est neutre à alcalin pour les macrolides (nystatine, amphotéricine B) [39].

- **Le solvant et le diluant** : la solution mère d'antifongique est généralement préparée dans un solvant organique (diméthylformamide ou diméthylsulfoxyde). Les dilutions sont faites avec des tampons phosphate.

La solution mère est préparée extemporanément.

- **La souche de référence** : elle est adaptée à chaque famille d'antifongique. Elle est choisie parmi les souches de référence répertoriées dans les instituts spécialisés [34] : ATCC (American Type Culture Collection).

#### **1.1. Avantages**

La méthode de dosage microbiologique présente l'avantage de ne nécessiter qu'un matériel peu coûteux, disponible dans tous les laboratoires de microbiologie. Sa réalisation est simple et d'exécution facile par le personnel technique. Elle s'applique au dosage de plusieurs antibiotiques [19].

## **1.2. Limites**

Elle constitue une méthode de réalisation longue (4 à 6 heures). Son délai de réponse peut varier entre 24 à 48 heures. Son exactitude est relativement modeste (de l'ordre de 15 %) et sa spécificité est conditionnée par la présence dans l'échantillon de substances qu'il est important de connaître.

La fidélité de la méthode, c'est-à-dire la constance de la détermination entre différentes mesures d'un même échantillon, est limitée par la reproductibilité de l'inoculum employé.

Le seuil de détection varie avec la souche de référence, mais des concentrations de 0,03 mg/l sont acceptables avec certaines espèces de bactéries [5, 8, 28].

Les polyènes sont très peu solubles dans l'eau. La substance de référence doit être dissoute dans un volume adéquat de solvant.

Certains antifongiques diffusent très mal dans la gélose et les diamètres obtenus sont petits. Il est possible d'améliorer le dosage en utilisant un milieu à base d'agarose [39].

## **2. ANALYSES DES RESULTATS**

Nous avons proposé une méthode alternative aux techniques classiques de modélisation pour la validation des méthodes de dosage microbiologique. Nous avons montré sur des exemples ponctuels que cette technique pouvait donner des résultats intéressants.

Par ailleurs, il a été difficile de comparer les résultats que nous avons obtenus avec ceux des autres auteurs, même si les méthodes de dosage microbiologique se développent. Elles répondent souvent à des objectifs variés et il n'est pas toujours possible de les comparer les unes des autres [8].

A travers notre étude, nous avons montré que les substances utilisées étaient toutes actives sur les germes. Dans la littérature, les auteurs Gherna R. et Pienta P. [14] ont donné un intervalle d'activité des antibiotiques.

Ainsi pour toutes les substances testées, nous avons trouvé une dose réelle (DR) inférieure à la dose mentionnée sur la forme pharmaceutique, excepté pour le cotrimoxazole dont la DR est égale à la dose mentionnée sur la forme pharmaceutique. Nous avons noté une bonne activité.

**Tableau XVI : Tableau récapitulatif de l'activité des différents échantillons testés**

Echantillons	Dose réelle (DR)	Dose mentionnée sur la forme pharmaceutique	Activité (A %)
Amoxicilline gélule	462,03 mg	500 mg	92,41
Tétracycline gélule	243,98 mg	250 mg	97,59
Gentamicine injectable	62,42 mg	80 mg	78,03
Erythromycine comprimé	435,71 mg	500 mg	87,14
Cotrimoxazole comprimé	480 mg	480 mg	100
Amphotéricine B gélule	221,43 mg	250 mg	88,57
Nystatine comprimé	487.012,99 UI	500.000 UI	97,40

En se basant sur la valeur des pentes (a) trouvées pour les différentes droites, nous pouvons dire que l'erreur est faible :

Amoxicilline :  $a = 0,2814$  ; Tétracycline :  $a = 0,264$   
 Gentamicine :  $a = 0,3038$  ; Erythromycine :  $a = 0,2218$   
 Cotrimoxazole :  $a = 0,4979$  ; Amphotéricine B :  $a = 0,2861$   
 Nystatine :  $a = 0,3452$

La valeur des coefficients de corrélation trouvée permet de dire que nos droites sont fiables. Elle permet également de conclure que la relation entre les deux variables est bien linéaire dans la mesure où le coefficient de corrélation  $r$  est proche de 1 :

- Amoxicilline :  $r = 0,97$  ; - Tétracycline :  $r = 0,98$
- Gentamicine :  $r = 0,98$  ; - Erythromycine :  $r = 0,99$
- Amphotéricine :  $r = 0,97$  ; - Nystatine :  $r = 0,99$

Excepté pour le cotrimoxazole où nous ne pouvons pas parler de linéarité entre les deux variables car le coefficient de corrélation  $r$  est négligeable.

Pour valider la méthode de dosage, nous avons travaillé avec des paramètres comme la répétabilité (une série de 3 essais dans un court instant par le même manipulateur).

Nous avons calculé la moyenne générale des diamètres d'inhibition pour la référence de chaque produit. Nous avons utilisé les concentrations comprises dans l'intervalle d'activité fourni par Gherna R. et Pienta P. [14] pour avoir une meilleure approche de la validation. En effet, la moyenne générale tient compte des résultats obtenus.

La précision de la méthode est donnée par la valeur du coefficient de variation qui apprécie l'écart-type et la moyenne des diamètres pour chaque dosage.

Nous avons calculé l'écart-type  $S$  qui caractérise la précision d'un résultat isolé et permet de calculer le coefficient de variation  $CV$  [6, 7, 11, 36].

La précision de la méthode est aussi liée à la stabilité des tampons, des milieux de culture et des substances de référence. Il faut noter que les poudres d'amphotéricine B, de nystatine, d'amoxicilline, de gentamicine, de tétracycline sont conservées entre 4 et 5°C.

Quant aux solutions d'amphotéricine B et de nystatine, elles deviennent instables après 24 heures de conservation [32, 34].

En pratique, l'établissement de courbes de concordance présente ses propres exigences et difficultés. Plus on dispose d'outils à tester sur un problème donné, plus on a de chance de tirer le meilleur parti de données en tenant compte des contraintes extérieures (temporelles et économiques).

D'autre part, nous avons noté des coefficients de variation inférieurs à 15 %, ce qui permet de dire que la méthode de dosage utilisée est reproductible, répétable et précise.

Par conséquent nous pouvons conclure, compte tenu des valeurs obtenues, que la méthode de dosage microbiologique par diffusion sur gélose est une méthode fiable et valide.



***CONCLUSION***

Ce travail a été entrepris sur les antibactériens (antibiotiques et antifongiques) dans le but de valider des essais et de vérifier la fiabilité des tests de validation par l'établissement de courbes de concordance.

Notre étude a porté sur les antibiotiques (amoxicilline, tétracycline, gentamicine, érythromycine, cotrimoxazole) et les antifongiques (nystatine, amphotéricine B).

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.

Au cours de cette étude, toutes les substances testées se sont montrées actives sur les germes.

Sur *Staphylococcus aureus*, nous avons utilisé la tétracycline (97,59 %), l'érythromycine (87,14 %), la gentamicine (78,03 %) et le cotrimoxazole (100 %) qui se sont révélés efficaces.

Sur *Escherichia coli*, l'amoxicilline (92,41 %) a été actif.

Sur *Candida albicans*, l'amphotéricine B (88,57 %) et la nystatine (97,40 %) ont donné des résultats satisfaisants.

Nous avons montré qu'il existait une relation linéaire entre les deux variables (x et y) et que les droites de régression étaient fiables d'après les coefficients de corrélation. Pour le cotrimoxazole, bien que la distribution ne soit pas homogène, nous avons montré qu'il existait une relation non linéaire entre les deux variables (x et y) à travers la valeur du coefficient de corrélation  $r = 0,001$ . La droite n'est pas à rejeter, dans la mesure où la prise de données n'est jamais faite dans des conditions idéales. On doit considérer que des facteurs (la température, etc.) sont hors de notre contrôle et influencent les résultats obtenus.

Dans le cadre de l'association de substances en général et en particulier le cotrimoxazole (sulfaméthoxazole + triméthoprime), il serait souhaitable d'associer le dosage du cotrimoxazole aux dosages du triméthoprime et du sulfaméthoxazole pour avoir une meilleure corrélation.

A travers les paramètres de validation, nous avons montré la précision de la méthode par la valeur du coefficient de variation comprise entre 0,03 % et 2,66 %.

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

Au décours de cette étude, nous pouvons dire que les méthodes de dosage sont fiables, efficaces et répétables.

Par ailleurs, cela ne nous empêche pas d'améliorer les 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. Et la logique économique oblige les Etats à privilégier les médicaments les moins chers. Or, le moins cher n'est pas toujours le meilleur. C'est pourquoi, il nous semble indispensable de mettre en place des systèmes fiables, efficaces et à notre portée pour assurer la qualité des médicaments.





***BIBLIOGRAPHIE***

**1. ADAIR F.W., GEFTIC S.G. and GELGER J.**

Résistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds

I. Growth in benzalkonium chlorid solution

*Appl. Microbiol.*, (1969), 18 : 299-302

**2. AFNOR (Association Française de Normalisation)**

Recueil de normes françaises

*NFT 72-150*, Paris (1989) 2<sup>ème</sup> édition p : 3-5

**3. ANHALT J.P., WASHINGTON II USA**

Preparation and dosage of antimicrobial solutions

In manual of clinical Microbiology, Lennette, Sparliding 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<sup>ème</sup> édition, (1983) : 11-16, 24-27, 122-126

**5. BARZA M., BRUSCH J., BREGERON M.G., WEINSTEIN L.**

Penetration of antibiotics into fibrin loci in vitro

*J. Infect. Dis.*, (1974), 129 : 73-78

**6. 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

**7. 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

**8. 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).

**9. DIATTA H.W.**

Validation des méthodes de contrôle microbiologique de différents médicaments antifongiques.

*Thèse Pharm.*, Dakar, 2003, n°8.

**10. DIOP A.**

Validation des méthodes de contrôle microbiologique des médicaments antiseptiques.

*Thèse Pharm.*, Dakar, 2003, n°44.

**11. DUVAL J., SOUSSY C.J.**

Abrégé de l'antibiothérapie

4<sup>ème</sup> édition Masson, Paris (1977, 1990) : 75-100

**12. FEINBERG M.**

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

*Analysis*, 1988, 20 : M23-M25

**13. FEINBERG M.**

L'assurance qualité dans les laboratoires agroalimentaires et pharmaceutiques

*Edition TEC et DOC*, Paris 1998 : p 309

**14. GHERNA R. et PIENTA P.**

Catalogue of bacteria and bacteriophages 17<sup>ème</sup> édition (1989) : 88, 204, 407

**15. GUEYE C. épouse DIALLO**

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

*Thèse Pharm.*, Dakar, 1996, n° 71.

**16. HELEN KOENING**

Guide de mycologie médicale.

*Ellipse (Ed. Marketing SA)*, (1995) : 22-27, 33-49, 74-75, 252-265.

**17. 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.

**18. LANET J.**

Le médicament : éthique et réalité industrielle. La qualité pharmaceutique, *Edition de Santé*, Paris, 1991, n° 3 : p 215

**19. LARPENT J.P.L.**

Biotechnologie des antibiotiques

*Masson*, Paris – Milan – Barcelone – Mexico (1989) : 15, 19

**20. LARSEN A.R., LEAL M.A.E., CHAN L.S.**

Fluconazole compared with amphotericin B

Flucytosine for *cryptococcal meningitis* in AIDS

*Ann. Intern. Med.*, (1990) : 113, 183-187

**21. LECHAT P., GLACIER G., ROUVEIX B., VINCENS M., WEBER S.**

Pharmacologie médicale

*4<sup>ème</sup> édition Masson*, Paris, 1973, 1982 : 681, 688, 693, 696.

**22. LE HIR, 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 Phama Pratiques*, ISSN 1997, Vol. n° 5, 1157-1497

**23. LORTHOLARY O., TODD M., DUPPONT B.**

Antifongiques

*Encycl. Med. Chir.*, (Elseviron, Paris), Mal. Infect., 8004-M.O.,1999: 21

**24. MEDOFF G., BRAJTBURG J., KIBAYASHI G.S., BOLARD J.**

Antifungal Agent Useful in systematic fungal infections

*Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, (1983) : 23, 303-330

**25. MOULIN M.**

Abrégé de Pharmacologie

*Masson*, Paris (1998) : 169

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

Imipenem penetration into bronchial secretions

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

**27. NDIAYE M.L.**

Validation des méthodes de contrôle microbiologique de différents médicaments antibiotiques.

*Thèse Pharm.*, Dakar, 2003, n°54 : 65.

**28. NDIAYE M.L.**

Validation des méthodes de contrôle microbiologique de différents médicaments antibiotiques.

*Thèse Pharm.*, Dakar, 2003, n°54 : 4.

**29. NAKASHIMA A.R., MC CAPHTY M.A., MARTONE W.J.**

Epidemic septic arthritis caused by *Serratia marcescens* and associated with a benzalkonium chlorid antiseptic

*J. Clin. Microbiology*, (1987), 25 : 1014-1018

**30. NDIAYE P. Nd.**

Contribution au contrôle de qualité des médicaments génériques de la pharmacie centrale au CHU de Fann

*Thèse Pharm.*, Dakar, 1999, n° 11

**31. NGOM Ng.**

Etude prospective sur les infections basses communautaires

*Thèse Pharm.*, Dakar (2001) n° 21 : 24-49

**32. O.M.S.**

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

*Edition OMS éd.*, Genève (1997) : 106-138

**33. PETIT JEAN O., JACOLOT A., TODD M.**

Pharmacologie des antifongiques azolés systémiques

*Méd. Mal. Infect.* (1995) : 14-26

- 34. PHARMACOPEE AMERICAINE (USP)**  
Médicaments antifongiques (2004) : 144-145, 1349
- 35. PHARMACOPEE EUROPEENNE**  
*Addendum*, (1999), 3<sup>ème</sup> édition : 272
- 36. PHARMACOPEE EUROPEENNE**  
*Addendum*, (1999), 3<sup>ème</sup> édition : 56-60
- 37. PHARMACOPEE EUROPEENNE**  
Méthode de dosage des médicaments  
3<sup>ème</sup> édition, (1999) : 56, 517, 1292
- 38. PHARMACOPEE INTERNATIONALE**  
Epreuves, méthodes, normes générales. Normes de qualité pour les substances, excipients et préparations pharmaceutiques.  
3<sup>ème</sup> édition O.M.S., Genève, (1994), volume 4 : 270-271
- 39. PILLY E.**  
Médicaments antifongiques  
15<sup>ème</sup> édition, Montmorency, édition 2M2 (1996) : 461-469
- 40. VAN CUTSEM J.S., JANSSEN J.**  
Les azolés antifongiques  
Med. Mal. Infect. (1984), 14 : 510-517
- 41. VASSAULT A., MOLLARD J.F., NAUDIU C., DUMONT G., AZZEDINE M.C., BAILY M. Et al**  
Dictionnaire des termes à l'usage de la validation de techniques (glossaire) document A  
*Ann. Biol. Clin.*, (1986), 44 : 679-685.
- 42. WOLF MANFRED E.**  
Burger's Medicinal chemistry and discovery fifth edition  
*Therapeutic Agent*, New York (1996), Vol. 2 : 637-652.

## **RESUME**

La microbiologie médicale s'intéresse tout particulièrement aux micro-organismes pathogènes, responsables de maladies infectieuses. Un des principaux rôles du bactériologiste consiste à aider le clinicien dans le choix d'une thérapeutique, en testant la sensibilité à divers antibactériens (antifongiques et antibiotiques) d'un micro-organisme en présence d'un antibiotique ou d'un antifongique et, d'un point de vue plus pratique, de prédire la réussite ou l'échec d'un traitement.

Mais au préalable, il faut assurer une bonne qualité de ces médicaments. Or, le contrôle du marché pharmaceutique est un véritable problème pour les pays en voie de développement et tous signalent l'existence de circuits d'approvisionnement illicites. Le marché parallèle est le lieu de prédilection pour écouler les médicaments non conformes.

Ces derniers le sont soit :

- par sous dosage pouvant l'être après dégradation du principe actif suite à de mauvaises conditions de stockage ou de transport ;
- par substitution totale du principe actif par un autre, liée à une erreur de conditionnement ;
- par défaut de fabrication comme l'absence d'uniformité de masse, un temps de désagrégation supérieure à la normale ou un surdosage.

Ce travail a été entrepris sur les antibactériens (antibiotiques et antifongiques) dans le but de valider des essais et de vérifier la fiabilité des tests de validation par l'établissement de courbes de concordance.

Notre étude a porté sur les antibiotiques (amoxicilline, tétracycline, gentamicine, érythromycine, cotrimoxazole) et les antifongiques (nystatine, amphotéricine B).

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.

Au cours de cette étude, toutes les substances testées se sont montrées actives sur les germes.

Sur *Staphylococcus aureus*, nous avons utilisé la tétracycline (97,59 %), l'érythromycine (87,14 %), la gentamicine (78,03 %) et le cotrimoxazole (100 %) qui se sont révélés efficaces.

Sur *Escherichia coli*, l'amoxicilline (92,41 %) a été actif.

Sur *Candida albicans*, l'amphotéricine B (88,57 %) et la nystatine (97,40 %) ont donné des résultats satisfaisants.

Nous avons montré qu'il existait une relation linéaire entre les deux variables (x et y) et que les droites de régression étaient fiables d'après les coefficients de corrélation. Pour le cotrimoxazole, bien que la distribution ne soit pas homogène, nous avons montré qu'il existait une relation non linéaire entre les deux variables (x et y) à travers la valeur du coefficient de corrélation  $r = 0,001$ . La droite n'est pas à rejeter, dans la mesure où la prise de données n'est jamais faite dans des conditions idéales. On doit considérer que des facteurs (la température, etc.) sont hors de notre contrôle et influencent les résultats obtenus.

Dans le cadre de l'association de substances en général et en particulier le cotrimoxazole (sulfaméthoxazole + triméthoprime), il serait souhaitable d'associer le dosage du cotrimoxazole aux dosages du triméthoprime et du sulfaméthoxazole pour avoir une meilleure corrélation.

A travers les paramètres de validation, nous avons montré la précision de la méthode par la valeur du coefficient de variation comprise entre 0,03 % et 2,66 %.



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

Au décours de cette étude, nous pouvons dire que les méthodes de dosage sont fiables, efficaces et répétables.

Par ailleurs, cela ne nous empêche pas d'améliorer les 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. Et la logique économique oblige les Etats à privilégier les médicaments les moins chers. Or, le moins cher n'est pas toujours le meilleur. C'est pourquoi, il nous semble indispensable de mettre en place des systèmes fiables, efficaces et à notre portée pour assurer la qualité des médicaments.