

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : Etudes Bibliographiques	
CHAPITRE I : Généralités Sur Les Antibiotiques	
1. Rappels sur les bactéries.....	3
1.1 Historique – Définition.....	3
1.2 Structure des bactéries.....	3
1.2.1 Moyens d'étude.....	3
1.2.2 Anatomie des bactéries.....	4
1.2.2.1 Les enveloppes bactériennes.....	4
1.2.2.2 Les constituants internes.....	6
1.2.2.3 Les appendices externes.....	6
1.2.2.4 La spore.....	8
1.3 Croissance des bactéries.....	8
1.3.1 En milieu solide.....	8
1.3.2 En milieu liquide.....	8
2. Rappels sur les antibiotiques.....	9
2.1 Classification des antibiotiques antibactériens.....	10
2.1.1 Classification générale.....	10
2.1.2 Les bêta lactamines.....	11
2.1.2.1 Les pénicillines.....	11
2.1.2.2 Les autres.....	12
2.1.3 Aminosides ou oligossacharides.....	12
2.1.4 Tétracyclines.....	12
2.1.5 Macrolides et apparentés.....	12
2.1.6 Sulfamide et triméthoprime.....	13

2.2 Propriétés des antibiotiques.....	13
2.2.1 Les bêta lactamines.....	13
2.2.1.1 Mécanisme d'action.....	13
2.2.1.2 Indications.....	13
2.2.1.3 Caractères physiques.....	14
2.2.2 Les aminosides.....	14
2.2.2.1 Mécanisme d'action.....	14
2.2.2.2 Indications.....	15
2.2.2.3 Caractères physiques.....	15
2.2.3 Les cyclines.....	15
2.2.3.1 Mécanisme d'action.....	15
2.2.3.2 Indications.....	16
2.2.3.3 Caractères physiques.....	16
2.2.4 Les macrolide.....	16
2.2.4.1 Mécanisme d'action.....	16
2.2.4.2 Indications.....	17
2.2.4.3 Caractères physiques.....	17
2.2.5 Sulfaméthoxazole + triméthoprime.....	17
2.2.5.1 Mécanisme d'action.....	17
2.2.5.2 Indications.....	18
2.2.5.3 Caractères physiques.....	18

CHAPITRE II : Dosage Des Antibiotiques

1. Dosages micro-biologiques.....	20
1.1 Diffusion sur gélose.....	20

1.2 Turbidimétrie.....	21
2. Autres méthodes de dosage.....	21
2.1 Dosages immunologiques.....	21
2.2 Caractérisations physico-chimiques.....	22
3. Paramètres de la validation.....	23
3.1 Linéarité ou domaine d'analyse.....	24
3.2 Limite de Détection.....	24
3.3 Précision ou Fidélité.....	25
3.4 Répétabilité et Reproductibilité.....	25
3.4.1 Répétabilité.....	25
3.4.2 Reproductibilité.....	26
3.5 Spécificité et Sélectivité.....	27
3.6 Sensibilité.....	27
3.7 Exactitude ou Justesse.....	27

DEUXIEME PARTIE : Expérimentation au Laboratoire

MATERIELS ET METHODES

1. Cadre de l'étude.....	29
2. Réactifs et matériels.....	29
2.1 Souches tests.....	29
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	30
2.1.1.1 Isolement.....	30
2.1.1.2 Examen microscopique.....	30

2.1.2 Staphylococcus	31
aureus.....	
2.1.2.1 Isolement.....	31
2.1.2.2 Examen microscopique.....	31
2.2 Milieux de culture.....	32
2.2.1 Compositions.....	32
2.2.1.1 Antibiotic medium 1.....	32
2.2.1.2 Antibiotic medium 2.....	33
2.2.1.3 Antibiotic medium 11.....	33
2.2.1.4 Muller Hinton.....	33
2.2.1.5 Gélose pour entretien des souches.....	34
2.2.2 Préparation.....	34
2.3 Solvants et diluants.....	35
2.3.1 Composition.....	35
2.3.1.1 Tampon 1 pH 6.....	35
2.3.1.2 Tampon 3 pH 7 – tampon 3 pH 8.....	35
2.3.1.3 Tampon 4 pH 4,5.....	35
2.3.1.4 Autres.....	35
2.3.2 Préparation.....	36
2.4 Substances de référence.....	37
2.5 Antibiotiques à doser.....	38
2.6 Matériels.....	39
3. Dosage par diffusion sur gélose.....	40
3.1 Principe.....	40
3.2 Mode opératoire.....	41
3.2.1 Préparation suspension de germes.....	41
3.2.2 Préparation gamme de dilution.....	41

3.3 Titrage.....	42
3.4 Lecture et expression des résultats.....	42
4. Applications.....	43
4.1 Tests de stérilité.....	43
4.1.1 Milieux de culture.....	43
4.1.2 Tampons.....	43
4.2 Tests d'efficacité.....	43
4.3 Dosage des bêta lactamines.....	44
4.3.1 Ampicilline.....	44
4.3.1.1 Réactifs.....	44
4.3.1.2 Mode opératoire.....	44
4.3.2 Amoxicilline.....	45
4.3.2.1 Réactifs.....	46
4.3.2.2 Mode opératoire.....	46
4.4 Dosage des Cyclines.....	47
4.4.1 Tétracycline gélule 250mg.....	48
4.4.1.1 Réactifs.....	48
4.4.1.2 Mode opératoire.....	48
4.4.2 Tétracycline pommade.....	49
4.4.2.1 Principe.....	49
4.4.2.2 Réactifs.....	49
4.4.2.3 Mode opératoire.....	49
4.5 Dosage des Aminosides.....	50
4.5.1 Amikacine.....	50
4.5.1.1 Réactifs.....	50
4.5.1.2 Mode opératoire.....	51

4.5.2 Gentamicine.....	51
4.5.2.1 Réactifs.....	52
4.5.2.2 Mode opératoire.....	52
4.6 Dosage macrolides.....	53
4.6.1 Réactifs.....	53
4.6.2 Mode opératoire.....	53
4.7 Dosage Sulfaméthoxazole + Triméthoprimine.....	54
4.7.1 Réactifs.....	54
4.7.2 Mode opératoire.....	54
4.8 Validation des méthodes de dosage.....	56
4.8.1 Répétabilité.....	56
4.8.2 Reproductibilité.....	56

RESULTATS

1. Résultats des tests préliminaires.....	57
1.1 Tests de stérilité.....	57
1.1.1 Milieux de culture.....	57
1.1.2 Tampons.....	57
1.2 Tests d'efficacité.....	57
2. Résultats des dosages.....	57
2.1 Ampicilline.....	57
2.2 Résultats des autres dosages.....	60
2.3 Doses réelles et activités des antibiotiques.....	64
3. Résultats de la validation.....	65
3.1 Résultats des différents essais.....	65

3.2 Calcul des variables.....	73
-------------------------------	----

DISCUSSION

1.Choix de la méthode de dosage.....	76
1.1 Avantages.....	76
1.2 Limites.....	77
2. Analyse des résultats.....	77
2.1 Activités des antibiotiques sur les souches testées.....	78
2.1.1 Sur <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	78
2.1.2 Sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	81
2.2 Validation de la méthode de dosage.....	83

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Introduction

Les bactéries ont été pendant longtemps responsables de maladies, mais aussi d'une forte mortalité surtout chez les enfants et les personnes âgées. Cependant, on note que la découverte du premier antibiotique, la pénicilline, par **Alexander Flemming** en juin 1929 (25) a entraîné une baisse considérable de cette mortalité.

Dès lors les premiers antibiotiques d'origine naturelle, ont vu leur efficacité améliorée par la mise au point de nouveaux antibiotiques produits par synthèse.

Des méthodes de dosage établies par les scientifiques permettent de vérifier l'efficacité des antibiotiques utilisés en thérapeutique. En effet, l'arsenal médicamenteux en croissante évolution a rapidement nécessité pour certaines molécules le développement d'un suivi thérapeutique. Ainsi, le dosage des médicaments en général et des antibiotiques en particulier fait maintenant partie des prescriptions classiques à l'hôpital et est devenu le complément nécessaire du bilan biologique (31). Plusieurs méthodes de dosage sont utilisées mais la méthode de diffusion sur gélose reste de loin la méthode la plus accessible et la plus employée en pratique courante au niveau des laboratoires.

La mise en route de tels types d'examens exige, comme pour la détermination des paramètres biologiques et biochimiques, une validation des méthodes de dosage mises en œuvre. Cette exigence de validation est pratique courante dans le domaine industriel où toute nouvelle méthode décrite dans un dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM) doit être accompagnée d'une validation complète (31).

La validation d'une méthode analytique peut être définie comme une démarche critique visant à s'assurer de sa qualité ou validité. L'objectif de la validation n'est pas de comparer une méthode à une autre mais de mieux connaître ses caractéristiques pour définir et juger la qualité du processus analytique (22, 31).

C'est pourquoi nous avons jugé nécessaire de faire une « validation de méthodes de contrôle microbiologique des médicaments antibiotiques » au sein du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (**LNCM**). Nous avons vérifié l'activité de certains antibiotiques sur des souches tests de bactérie et validé la méthode de dosage par certains paramètres de la validation (répétabilité et reproductibilité). C'est l'objet de notre recherche, avec le dosage microbiologique des antibiotiques par une technique de diffusion en milieu gélosé.

Première partie :

Etudes bibliographiques

Chapitre I :

Généralités sur les antibiotiques

1 - RAPPELS SUR LES BACTERIES

1. 1 HISTORIQUE - DEFINITION (3)

Le monde vivant est constitué de trois règnes : le règne animal, le règne végétal et le règne des protistes.

Le règne des protistes proposé par **Haeckel** (1866) a été subdivisé par **Chatton** (1937) en protistes supérieurs ou Eucaryotes (Algues, Protozoaires, champignons) et en protistes inférieurs ou protocaryotes (bactéries, Algues bleues) constitués d'un chromosome unique et dépourvu de membrane nucléaire.

Les bactéries ou *Schizomycetes* constituent le groupe le plus important et le plus diversifié des protistes protocaryotes. Elles sont caractérisées par l'existence d'une paroi rigide le peptidoglycane qui conditionne les trois formes morphologiques fondamentales : sphérique (coque), cylindrique (bacille), spiralée. Les bactéries se multiplient habituellement par scissiparité mais peuvent aussi présenter des recombinaisons génétiques partielles. Il faut cependant distinguer les protistes des virus.

1. 2 STRUCTURE DES BACTERIES (3)

1. 2. 1 Moyens d'étude

L'étude des bactéries se fait selon plusieurs techniques et utilise soit :

- **Le microscope optique** : permet de faire :

Un état frais entre lame et lamelle qui renseigne sur la forme et la mobilité des bactéries ;

Un examen après fixation et coloration pour mieux apprécier leur morphologie. Il existe de nombreuses colorations et la plus utilisée est la coloration de Gram.

- **Le microscope électronique** : utilisé pour les travaux de recherche et permet l'étude fine de la bactérie.
- **Le fractionnement des bactéries** : il utilise différents moyens qui font intervenir des procédés physiques (utilisation de micro-billes), chimiques (utilisation d'antibiotiques et de détergents) et physico-chimiques (centrifugation différentielle, filtration).

1. 2. 2 Anatomie des bactéries

1. 2. 2. 1 Les enveloppes bactériennes

- **la capsule** : c'est le constituant le plus superficiel, elle joue un rôle dans la virulence de la bactérie et permet une classification antigénique des bactéries capsulées.
- **Le glycocalyx** : c'est un feutrage des fibres polysaccharidiques qui entoure les bactéries placées dans leur milieu naturel et qui leur permet d'adhérer à leur support. Il joue un rôle dans l'élaboration de la plaque dentaire par *Streptococcus mutans*.
- **La paroi** : c'est une enveloppe rigide qui assure la forme de la bactérie. Elle est absente chez les *Mycoplasmes*. Sa structure est différente selon qu'il s'agit de bactéries Gram (+) ou Gram (-) mais elles ont en commun le péptidoglycane, un polymère macromoléculaire entourant la bactérie.

La paroi des bactéries Gram (+) est relativement épaisse et constituée en majeure partie par le péptidoglycane. Les polyosides, responsables de la spécificité antigénique des bactéries, sont branchés sur la paroi.

La paroi des bactéries Gram (-) possède une mince couche de péptidoglycane recouverte d'une couche tri-lamellaire appelée « enveloppe externe ». Cette couche contient des protéines, des lipides et le lipopolysaccharide. Ce dernier porte l'antigène O ou antigène de surface utilisé pour la classification de certaines espèces bactériennes. La perméabilité de la paroi à l'alcool explique le caractère Gram (-) des bactéries.

La paroi est douée de plusieurs fonctions surtout :

- **Dans la coloration de Gram**

La coloration de Gram est une coloration différentielle basée sur la perméabilité plus grande de la paroi des bactéries Gram (-) à l'alcool.

Elle consiste dans un premier temps à réaliser un complexe colorant soluble dans l'alcool (cristal-violet, lugol) qui colore en violet le cytoplasme de toutes les bactéries.

Dans un second temps, intervient la décoloration par l'alcool qui traverse bien la paroi des bactéries Gram (-) et dissout le complexe colorant. Chez les bactéries Gram (+), la paroi ne se laisse pas traverser.

Dans un troisième temps, on fait une contre coloration par la fushine.

Seules les bactéries décolorées par l'alcool fixent la fushine et apparaîtront rouges : on les dit bactéries Gram (-). A l'inverse les bactéries Gram (+) ont conservé la coloration du premier temps :

Dans la forme des bactéries

Dans l'antigénicité

Dans l'action des antibiotiques

Membrane cytoplasmique : située sous la paroi à son contact. L'adhésion n'est pas toujours parfaite, elle délimite l'espace péri-plasmique. La membrane forme une barrière osmotique, contient des systèmes de transport et des enzymes. La cellule se divise par scissiparité.

1. 2. 2 . 2 Les constituants internes

- **Le cytoplasme** : il est constitué d'une machinerie nécessaire aux synthèses protéiques et de nombreux ribosomes constitués de protéines et d'ARN. Il possède 2 sous-unités qui, chez les bactéries sont de 50S et 30S. On y retrouve aussi des granulations, formes de stockage des constituants.
- **Le noyau** : il est mis en évidence au microscope optique après coloration de Feulgen. En microscopie électronique on a une structure fibrillaire. Le chromosome bactérien est un filament d'ADN bicaténaire, circulaire nu, organisé en certain nombre de boucles stabilisées par un noyau d'ARN.
- **L'ADN extra-chromosomique** ou plasmide

1. 2. 2. 3 Les appendices externes

- **Flagelle** : il assure la mobilité de la bactérie
- **Les pili ou fimbriae** : ils existent chez de nombreuses bactéries Gram (-) et ne sont apparents qu'en microscopie électronique. Nous avons des pili communs qui interviennent dans la fixation de la bactérie et des pili sexuels qui interviennent dans la conjugaison bactérienne.

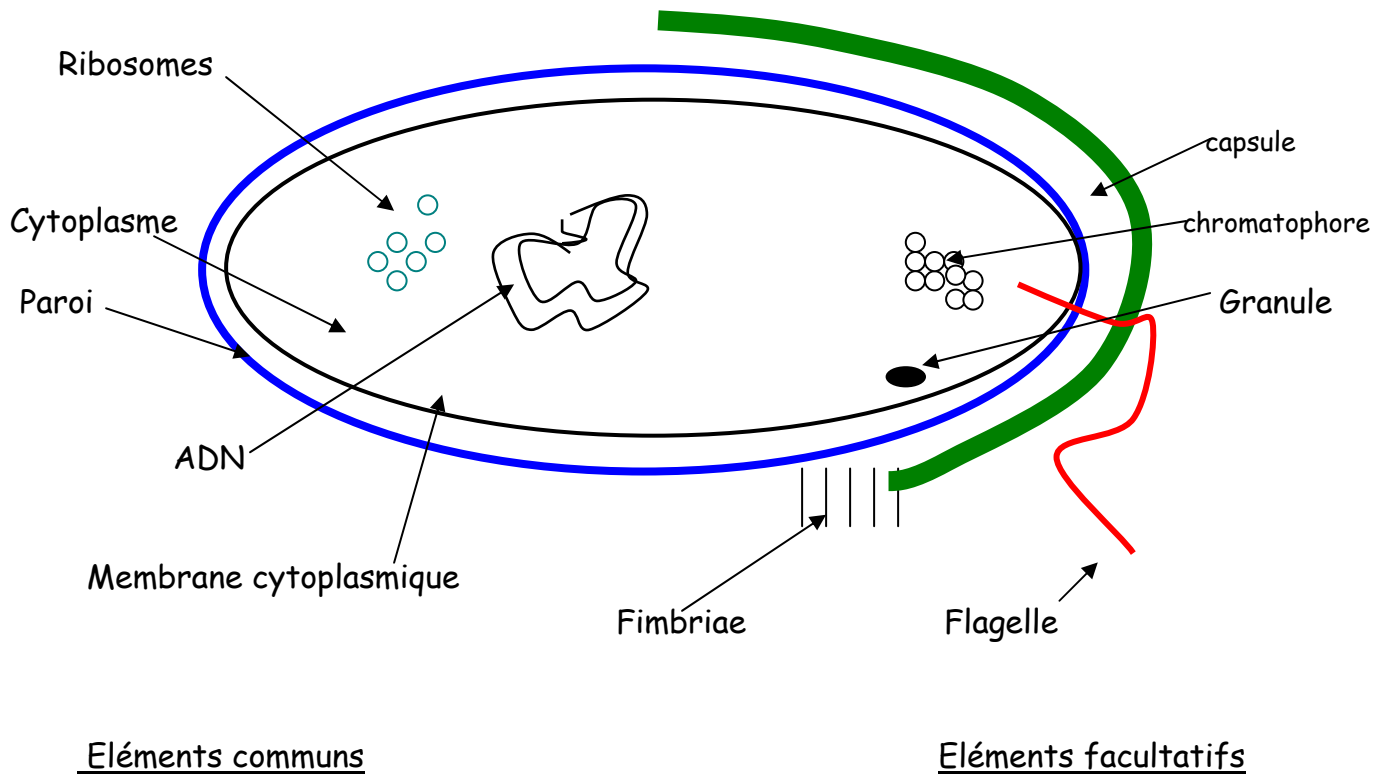


Figure 1 : anatomie bactérienne

1. 2. 2. 4 La spore

Certaines espèces de bactéries, dites sporulées, ont la propriété, quand elles sont placées dans des conditions d'environnement défavorables, de donner naissance à des spores qui vont pouvoir résister indéfiniment au froid et à la dessiccation. Quand des conditions favorables se manifestent de nouveau, la spore redonne des bactéries végétatives identiques à celles qui lui ont donné naissance.

La spore possède des constituants que l'on ne rencontre pas chez la bactérie en phase végétative et inversement. La sporulation représente donc un modèle intéressant pour approcher l'étude de la différenciation cellulaire.

Parmi les propriétés les plus remarquables des spores, il faut citer la thermo-résistance. Les méthodes de stérilisation par la chaleur doivent donc tenir compte de cette propriété.

1 – 3 CROISSANCE DES BACTERIES (3)

1 – 3 – 1 En milieu solide

Si on pose une cellule bactérienne à la surface d'une gélose nutritive, elle se multiplie et forme un amas visible à l'œil nu dès qu'elle contient un million (10^6) de bactéries ; ce qui correspond à vingt générations. Sur la gélose on a des colonies lisses (S), muqueuses (M) ou rugueuses (R)

1 – 3 – 2 En milieu liquide

Une population microbienne est définie par deux grandeurs habituellement mesurées par unité de volume de milieu, la densité microbienne et la concentration

cellulaire. L'accroissement de ces deux paramètres constitue le phénomène de la croissance. La mesure de la croissance se fait par des méthodes :

- ✓ directes par numération totale et numération viable
- ✓ indirectes par détermination du poids sec
 - dosage de l'azote bactérien
 - mesure de l'activité enzymatique des bactéries
 - mesure optique par turbidimétrie

2 - RAPPELS SUR LES ANTIBIOTIQUES (20)

Le terme antibiotique signifie toute substance d'origine naturelle ou synthétique ayant une toxicité sélective envers le ou les micro-organismes visés et au contraire une toxicité suffisamment faible vis à vis de l'hôte humain, animal ou végétal pour qui son administration puisse être réalisée par voie générale.

Les antibiotiques sont caractérisés par :

Une activité antibiotique ou antifongique

Une toxicité sélective grâce à un mécanisme d'action spécifique.

Une activité en milieu organique dans le sang et les tissus.

Une bonne absorption et une bonne diffusion dans l'organisme

2. 1 CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES ANTIBACTERIENS

2. 1. 1 Classification généraleTableau I : Classification générale des antibiotiques

Familles	Sites d'action Modes d'action	Origine
Béta-lactamines Pénicillines →	Paroi, bactéricide →	<i>Penicillium</i> , semi-synthèse
Céphalosporines →	Paroi, bactéricide →	<i>Céphalosporium</i> , semi-synthèse
Céphamycines →	Paroi, bactéricide →	<i>Streptomyces</i> , semi-synthèse
Aminosides →	Ribosomes bactéricide 30 S →	<i>Streptomyces</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Micromonospora</i>
Chloramphénicol →	Ribosome bactéricide 50S →	<i>Streptomyces</i> , synthèse
Tétracyclines →	Ribosome bactériostatique 50S →	<i>Streptomyces</i> semi-synthèse
Macrolides–lincosamines } Streptogramines }	Ribosome bactéricide 50S →	<i>Streptomyces</i>
Polypeptides →	Membrane cytoplasmique bactéricide →	<i>Bacillus</i>
Rifampicine →	RNA polymérase bactéricide →	<i>Streptomyces</i> , <i>nocardia</i>
Quinolones →	DNA gyrase, bactéricide →	Synthèse
Sulfamides } Triméthoprime }	Métabolisme folates bactériostatique →	Synthèse
Vanomycine } Novobiocine } Fosfomycine }	Paroi, bactéricide →	<i>Streptomyces</i>
Acide fusidique →	DNA, bactéricide →	<i>Fusidium</i>
Nitrofurane →		Synthèse

2. 1. 2 Les Béta-lactamines

Ce sont des antibiotiques protidiques qui regroupent les antibiotiques bactéricides ayant un cycle bêta-lactame. Nous avons :

Pénicillines

Céphalosporines

Autres

2. 1. 2. 1 Les pénicillines

Elles sont divisées en plusieurs groupes selon leur spectre antibactérien :

- **Pénicilline G**

Elle est active sur les bactéries Gram (+) (cocci et bacilles) à l'exception de *Staphylococcus* producteur de pénicillinase.

- **Pénicilline M**

Elle a le même spectre que la pénicilline G mais il n'est pas inactivé par la pénicillinase des *Staphylococcus*.

- **Groupe à large spectre**

Il a le même spectre que la pénicilline G mais il est aussi actif sur les bacilles Gram (-) non producteur de pénicillinase. On a :

- Pénicilline A ou Aminopénicilline :

Nous avons l'ampicilline qui est inactif sur le bacille pyocyanique.

- Carboxypénicilline, Ureidopénicilline, Apalcilline

Elles sont actives sur le bacille pyocyanique.

- Amidinopénicilline

Nous avons le Mecillinam actif uniquement sur les germes Gram (-).

2. 1. 2. 2 Les autres

Il s'agit des inhibiteurs des bêta-lactamases. Ils n'ont pas d'activité antibactérienne propre mais sont utilisés en association avec une autre bêta-lactamine en particulier avec une pénicilline à large spectre pour la protéger de l'action des bêta-lactamases : Acide clavulanique, Sulbactam

2. 1. 3 Aminosides ou oligosaccharides

Ce sont des antibiotiques osidiques, bactéricides à large spectre mais inactifs sur les *streptocoques* et les bactéries anaérobies strictes. Nous avons deux groupes selon la structure :

- Groupe Streptomycine ayant un noyau Streptidine
- Groupe Deoxystreptamine à noyau Deoxystreptamine qui comprend :
Kanamycine, Tobramycine, Sisomycine, Netilmycine, Debikacine, Apramycine, Amikacine, Gentamicine.

2. 1. 4 Tétracyclines

Ce sont des antibiotiques à cycles condensés, bactériostatiques à large spectre. Ces produits diffèrent par leurs propriétés physiques et pharmacologiques.

2. 1. 5 Macrolides et apparentés

Ce sont des antibiotiques osidiques regroupant des antibiotiques à structure très différentes et un spectre limité aux cocci Gram (+), aux bacilles Gram (+) et aux anaérobies strictes. Nous avons trois groupes :

- Macrolides vrais bactériostatiques : Erythromycine, Spiromycine.
- Lincosamine actif sur *Staphylocoques* et anaérobie (lincomycine).
- Synergistine (Streptogramine) bactéricide intense sur *Staphylocoques* (virgimycine).

2.1.6 Sulfamide et Triméthoprine

Ce sont des antibiotiques protidiques à large spectre et bactériostatiques, en association ils sont bactéricides.

2.2 PROPRIETES DES ANTIBIOTIQUES (3, 20)

2.2.1 Les Béta-lactamines

2.2.1.1 Mécanisme d'action (3, 12, 20, 34)

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.

2.2.1.2 Indications

Ils sont indiqués dans les infections sévères à bactéries Gram (+) ou Gram (-) (septicémie, méningite, endocardite) ; seuls ou en association.

Pénicilline G active sur *Streptocoques* (angines)

Pénicilline M active sur *Staphylocoque*

2. 2. 1. 3 Caractères physico-chimiques (29)

L'ampicilline anhydre est une poudre cristalline blanche ou presque blanche, inodore ou presque. Elle est très stable en milieu acide et est donc peu active par voie orale à cause de sa médiocre absorption digestive. Elle est plutôt utilisée sous forme injectable.

Le produit est conservé dans un récipient étanche à l'abri de la lumière et à une température ne dépassant pas 25°C. Même à l'abri de la lumière, l'ampicilline s'altère à l'air humide, d'autant plus vite que la température est plus élevée.

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. 2. 2 Les aminosides

2. 2. 2. 1 Mécanisme d'action (3)

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. 2. 2. 2 Indications (3)

Ils sont indiqués dans les infections sévères à bactéries Gram (+) ou Gram (-) le plus souvent en association avec une Béta-lactamine en particulier dans les infections graves à *Streptocoques*, une quinolone ou une rifampicine.

2. 2. 2. 3 Caractères physiques (29)

- **Amikacine** : C'est une poudre cristalline blanche presque inodore modérément soluble dans l'eau. Elle se conserve dans un récipient étanche.
- **Gentamicine sulfate** : La gentamicine est le sulfate des fractions C₁, C₂, C_{1a} 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. 2. 3 Les Cyclines

2. 2. 3. 1 Mécanisme d'action (3)

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. 2. 3. 2 Indications (3)

Les tétracyclines sont indiqués dans les infections locales (respiratoires, génito-urinaires...). Malgré leur spectre naturel très large [Gram (+) , Gram (-), *Mycoplasmes*, *Chlamydiae*], beaucoup de bactéries sont devenues peu sensibles (*Staphylocoques*, *Entérobactéries*, *Pseudomonas*, *Streptocoques* α -hémolytiques).

2. 2. 3. 3 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 = 75g/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. 2. 4 Les macrolides

2. 2. 4.1 Mécanismes d'action (3)

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, Aleandomycine,...) agissent à un stade plus tardif en inhibant la translocation.

2. 2. 4. 2 Indications (3)

Les macrolides vrais sont indiqués dans les infections localisées qui ne sont pas dues aux entérobactéries ou aux *Pseudomonas* : infections ORL (angines aiguës, otites,...), infections aiguës des voies respiratoires, infections en odontostomatologie, infections uro-génitales.

2. 2. 4. 3 Caractères physiques (26, 29)

L'Erythromycine 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 = 750g/LTS, éther R, chloroforme R.

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

2. 2. 5 Sulfaméthoxazole + Triméthoprime

2. 2. 5. 1 Mécanismes d'action (3)

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 (PAB).

2. 2. 5. 2 Indications

Le cotrimoxazole est indiqué dans :

- les infections hautes ou basses, prostatites, orchites, épидидymites
- le traitement curatif et préventif de la pneumocystose
- en deuxième intention dans la typhoïde, les Salmonelloses, la gonococcie, le chancre mou, les otites
- indications potentielles dans les méningites à *Listeria monocytogenes*, la nocardiose, les infections à *Staphylocoques*.

2. 2. 5. 3 Caractères physiques (30)

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

- **Triméthoprime** : 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.

Chapitre II :

Méthodes de dosage des antibiotiques

1 – DOSAGES MICRO BIOLOGIQUES

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 GELOSE (20)

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 établie dans le domaine de la linéarité, et éventuellement reportée 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 TURBIDIMETRIE (MILIEU LIQUIDE)

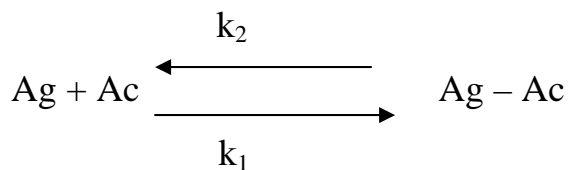
Elle consiste à incuber des tubes calibrés contenant à la fois le milieu de culture inoculé avec une bactérie sensible et les solutions de l'antibiotique à doser (ou de la solution standard).

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

2 - AUTRES METHODES DE DOSAGE (3, 5, 27, 28)

2. 1 DOSAGES IMMUNOLOGIQUES

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 définit pour une température donnée par une constante **K**.

$$\mathbf{K} = k_1 / k_2$$

k_1 et k_2 représentent respectivement la constante de formation et de dissociation du complexe antigène – anticorps. **K** peut être exprimé par :

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

Parmi ces méthodes nous avons les méthodes d'immunoflorescence et immunoenzymatique : l'**ELISA** (Enzyme Linked Immuno Sorban Assay) et l'**EMIT** (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique).

2. 2 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** nous avons :
 - la chromatographie d'adsorption,
 - la gel-filtration ou chromatographie de partage, où la phase stationnaire est un liquide et la phase solide est un gel.
- **La chromatographie analytique** nous avons :
 - la chromatographie sur couche mince (**CCM**) c'est un procédé de séparation dans lequel la phase stationnaire est un matériau adéquat, étalé en une couche mince uniforme, fixée sur un support de verre, de métal ou de plastique. La séparation s'effectue par migration de solutés dans un solvant sur la couche mince.
 - la chromatographie en phase gazeuse (**CPG**) la phase mobile est

un gaz vecteur et la phase stationnaire contenu 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**) c'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.

3 - PARAMETRES DE LA VALIDATION (22, 35, 36, 37, 38, 39, 40)

La validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves effectives du fait que les prescriptions particulières d'une méthode analytique en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies. La validation a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique déterminée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faudra donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel il sera employé. En effet la validation inclut la spécification des exigences, la détermination des caractéristiques des méthodes, la comparaison des exigences aux valeurs des caractéristiques de la méthode, ainsi qu'une déclaration relative à la validité.

Ainsi la validation d'une méthode permet de connaître ses caractéristiques pour définir et juger la qualité du processus analytique : (reproductibilité, répétabilité,

précision, exactitude, spécificité, linéarité et domaine d'utilisation, sensibilité, limite de détection) et d'en préciser les limites de validité.

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

- Linéarité et domaine d'utilisation
- Répétabilité et reproductibilité
- Limite de détection
- Précision
- Exactitude
- Sensibilité

3.1 LINEARITE OU DOMAINE D'ANALYSE

Il s'agit d'une évaluation des limites haute et basse de la relation linéaire existant entre la concentration de l'analyte observée 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.

3.2 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. 3 PRECISION OU FIDELITE

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.

3. 3.1 REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE

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

3. 3.1.1 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 :

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

$$S = \sqrt{V}$$

3.3.1.2 Reproductibilité

C'est la précision de la méthode lorsqu'elle est appliquée dans des conditions différentes, généralement dans des 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

3.4 SPECIFICITE ET SELECTIVITE

La spécificité 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.

3. 5 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.

3. 6 EXACTITUDE OU JUSTESSE

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

Deuxième partie :

Expérimentation au laboratoire

Matériels et Méthodes

1- CADRE DE L'ETUDE

Notre étude a été réalisée au laboratoire national de contrôle des médicaments (LNCM) chargé du contrôle de la qualité des médicaments. Le laboratoire comporte plusieurs bureaux :

- Assurance qualité
- Physico-chimie et pharmacotechnie
- Microbiologie
- Vaccins (fièvre jaune)
- Gestion

Il fonctionne sous la direction d'un pharmacien chef qui est un Docteur d'Etat en Pharmacie. Il est aidé dans sa lourde tâche par des docteurs en pharmacie, d'une secrétaire, d'un responsable de la logistique, des techniciens et d'un gestionnaire.

2- REACTIFS ET MATERIELS

2.1 SOUCHES TESTS

Nous avons travaillé avec différentes souches de bactéries tests qui nous ont permis de déterminer l'activité des antibiotiques de notre étude. Nous avons utilisé le schéma habituel pour l'isolement et l'identification des souches bactériennes.

Nous avons réisolé les souches sur des milieux antibiotiques, puis nous les avons identifiées par des galeries classiques complétées par des mini galeries d'identification et au besoin par des méthodes d'identification sur microplaques CSB system (11).

2.1.1 *Escherichia coli*

Encore appelés colibacilles, ce sont des bacilles Gram (-) généralement mobiles, certaines souches sont parfois capsulées. Ils appartiennent au groupe des entérobactéries et constituent des hôtes normaux de l'intestin. Ils sont responsables de la majorité des infections du tractus urinaire, de la méningite du nourrisson et des infections intestinales surtout liées au péril fécal.

2. 1. 1. 1 Isolement

Nous avons ensemencé en stries la souche de bactérie sur le milieu de culture coulé en boîte de pétri à l'aide d'une anse de platine. Nous avons travaillé en respectant les conditions d'asepsie et de stérilité puis nous avons incubé à 37°C pendant 24 heures.

Escherichia coli se présente sous forme de colonies moyennes lisses à bords réguliers, transparentes et non pigmentées.

2. 1. 1. 2 Examen microscopique

Etat frais : bacilles mobiles péritriches

Gram : bacilles Gram (-).

2. 1. 2 *Staphylococcus aureus*

Les *Staphylocoques* appartiennent à la famille des *Micrococcaceae* et au genre *Staphylococcus*. Ce dernier est caractérisé par son mode de groupement en grappe de raisin.

Ce sont des cocci Gram (+), ils sont présents dans l'environnement et vivent très fréquemment à l'état de commensal sur la peau et les muqueuses des organes animaux et humains. Ce sont aussi des germes pathogènes donc responsables de maladies

2. 1. 2. 1 Isolement

Nous avons ensemencé sur gélose en stries avec une anse de platine et nous avons incubé à 37°C pendant 24 heures.

Staphylococcus aureus a été souvent présenté sous forme de colonies volumineuses, pigmentées et entourées d'une auréole jaune car le germe a fermenté le mannitol. C'est un germe coagulase et catalase positif.

2. 1. 2. 2 Examen microscopique

Etat frais : grosses colonies d'orées groupées en grappe de raisin.

Gram : cocci Gram (+)

2. 2 MILIEUX DE CULTURE (1)

Nous avons travaillé avec des milieux adaptés à chaque antibiotique. Les milieux de culture se définissent comme des supports nutritifs stériles, permettant aux bactéries qui sont à leur contact d'y trouver les éléments nécessaires à leur croissance. Ces éléments sont des sources de carbone, d'azote, d'énergie et d'oligo-éléments.

2. 2. 1 Compositions

2. 2. 1. 1 Antibiotic Medium₁ (AM₁)

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

Remarque : Pour la préparation du milieu AM₁ nous avons pesé 3,05g de poudre pour 100ml d'eau distillée. Puis avant stérilisation nous avons ramené le pH à 6,6 par addition de NaOH 10N ou HCl 0,1N.

2. 2. 1. 2 Antibiotic Medium₂ (AM₂)

- Extrait de viande de bœuf	1,5g
-----------------------------	------

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

Remarque : Pour la préparation du milieu AM₂ nous avons pesé 2,55g de poudre pour 100ml d'eau distillée.

2. 2. 1. 3 Antibiotic Medium ₁₁ (AM₁₁)

Il a la même composition que le milieu AM₁ mais son pH final est de 8,3.

2. 2. 1. 4 Muller Hinton (MH)

- Infusion de viande de bœuf	300g	
- Biocase		17,5g
- Amidon		1,5g
- Gélose		17g
- Eau		1000ml
- pH		7,3

Remarque : Pour la préparation nous avons pesé 3,5g de poudre pour 100ml d'eau distillée et le pH est ramené à 7,3.

2. 2. 1. 5 Gélose pour entretien des souches (GES) (1)

- Peptone trypsine de caséine	15g
- Peptone de soja	5g
- Chlorure de sodium	5g
- Agar-agar en poudre	12 – 18g
- Eau	1000ml
- pH	4,2 \pm 0,2 à 20°C

Remarque : Après préparation, la gélose est coulée en pente dans des tubes stériles et les tubes sont conservés au réfrigérateur 4°C.

2. 2. 2 Préparation (2)

Nous avons :

- pesé la poudre prête à l'emploi (Difco)
- dissout la poudre dans 100ml d'eau distillée
- homogénéisé le mélange avec un agitateur magnétique
- chauffé-le tout au bec bunsen dans une casserole
- versé le milieu dans un flacon stérile adapté
- vérifié le pH avec un pH-mètre
- stérilisé à l'autoclave 121°C pendant 15mn
- conservé au réfrigérateur 4°C

2. 3 SOLVANTS ET DILUANTS

2. 3. 1 Compositions

2. 3. 1. 1 Tampon₁ pH 6

1g phosphate di-potassique }
4g phosphate mono-potassique } pour 500ml eau distillée

2. 3. 1. 2 Tampon₃ pH 7 - Tampon₃ pH 8

8,365g phosphate di-potassique }
0,262g phosphate mono-potassique } 500 ml eau distillée

Ajuster les pH à 7 ou 8 selon les besoins par addition de soude 10N ou HCl 0,1N.

2. 3. 1. 3 Tampon₄ pH 4,5

6,8g phosphate monopotassique pour 500ml eau distillée.

2. 3. 1. 4 Autres...

- Eau distillée stérile
- Eau physiologique stérile
- Méthanol
- HCl 0,01N – HCl 0,1N
- NaOH 10N
- Ether de pétrole

2. 3. 2 Préparation

Nous avons :

- dissout les cristaux dans 500ml d'eau distillée
- mélangé avec l'agitateur magnétique
- vérifié le pH et stérilisé à l'autoclave 121°C pendant 15mn

2. 4 SUBSTANCES DE REFERENCE (TABLEAU II)

Ce sont des antibiotiques de référence avec lesquels nous avons préparé des solutions 10 fois plus concentrées que la plus forte concentration prévue dans la gamme d'étalonnage. Nous avons fait une dilution au $1/10^e$, puis $1/2$ en $1/2$ avec un diluant adapté au pH de l'antibiotique. Nous avons travaillé avec 5 concentrations correspondant à 5 dilutions.

Tableau II : Substances de référence

Substances de références	N° Lot	Conservation
Sulfaméthoxazole	114H0160	Température ambiante ou dessicateur
Erythromycine	84H0453	Dessicateur
Sulfate Amikacine	SL021	Réfrigérateur 4°C
Triméthoprim	114H0139	Réfrigérateur 4°C
Amoxicilline	29F0730	Réfrigérateur 4°C
Tétracycline	74h0385	Réfrigérateur 4°C
Ampicilline sodique	9M14078	Réfrigérateur 4°C
Gentamicine sulfate	3C	Réfrigérateur 4°C

2.5 ANTIBIOTIQUES A DOSER (VOIR TABLEAU III)

Nous avons travaillé avec des échantillons présentés sous différentes formes à savoir : gélule, comprimé, sirop, pommade, injectable etc...

Ces médicaments ont été recueillis à la pharmacie IB (Initiative de Bamako) et centrale de l'Hôpital Aristide Le Dantec.

Tableau III : Antibiotiques à doser

Familles antibiotiques	DCI	Noms commerciaux	Formes	Doses (mg)
Béta – lactamines	Amoxicilline	Amoxicilline R	Gélule	500
		Penamox	Sirop	250
		Amoxicilline R	Injectable	1000
	Ampicilline	Ampicilline R	Injectable	1000
Cyclines	Tétracycline	Tétracycline R	Gélule	250
		Adcocyline	Pommade	3%
		Métacycline	Pommade	1%
Aminosides	Amikacine	Amiklin	Injectable	250
	Gentamicine	Gentamicine R	Injectable	80
Sulméthoxazole + Triméthoprime	Cotrimoxazole	Cotrex	Comprimé	400 + 80
			Sirop	200 + 40
Macrolides	Erythromycine	Ericyn	Comprimé	500

2. 6 MATERIELS

- Four micro-onde

- Hotte à flux laminaire
- Autoclave
- Réfrigérateur 4°C
- Congélateur -70°C
- Incubateur
- Etuve
- Balance de précision
- Bain-marie
- Mortiers – pilons
- ReadBiotic
- Pied à coulisse
- Tubes à essai
- Tubes Mac farland 0,5
- Tubes à hémolyse
- Tubes coniques
- Flacons en verre
- Pissette
- Spatules
- Papier kraft
- Papier aluminium
- Goupillons
- Pinceaux
- Herlenmeyers
- Fioles

- Becher
- Agitateur magnétique aimant
- Vortex
- Pipette en verre
- Pipette à usage unique
- Pipette pasteur
- Pipette-aide
- Bouteille de gaz et allume-gaz
- Gants stériles – gants d'examen
- Portoirs pour tubes
- Casserole
- Bec bunsen
- Anse en platine – anse en plastic
- Boites de pétri
- Disques non imprégnés

3 - DOSAGE PAR DIFFUSION SUR GELOSE

3.1 PRINCIPE

Le dosage consiste à déterminer la sensibilité d'une souche de bactérie à un antibiotique déterminé lorsque cette souche est soumise à différentes dilutions de l'antibiotique.

Le dosage utilise la méthode de diffusion sur gélose qui consiste à comparer le diamètre d'inhibition obtenu avec l'échantillon à doser disposé à la surface d'une gélose ensemencée d'une bactérie sensible, au diamètre d'une gamme de concentrations connues de la substance de référence.

L'activité du médicament par rapport à l'étalon est déduite de cette comparaison.

3. 2 MODE OPERATOIRE

3. 2. 1 Préparation suspension de germes

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

3. 2. 2 Préparation gamme de dilution

- *Etalon*

$$m \text{ (mg)} = \frac{C \text{ (}\mu\text{g/ml)} \times V \text{ (ml)}}{T \text{ (}\mu\text{g/mg)}}$$

m = masse à peser

C = concentration

V = volume

T = titre

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

- *Antibiotique à doser*

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

3. 3 TITRAGE

Nous avons :

- régénéré le milieu de culture et mis en surfusion entre 45 et 50°C.
- préparé 0,1ml de suspension de germes avec 100ml de milieu de culture

- coulé sur 3 à 5 boîtes de pétri stériles
- laissé solidifier à la température ambiante
- déposé les disques stériles à l'aide d'une pince stérile
- chargé les disques avec 15µl de chaque dilution
- laissé diffuser 2 heures à la température ambiante
- incubé à 37°C pendant 24 heures .

3.4 LECTURE ET EXPRESSION DES RESULTATS

▪ **Mesure de la dose réelle (DR)**

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

DR = dose réelle

DT = dose mentionnée sur la forme pharmaceutique

D = moyenne diamètres inhibition échantillon

E = moyenne diamètres inhibition étalon

▪ **Mesure de l'activité (A)**

$$\left. \begin{array}{l} DT = 100\% \\ DR = A\% \end{array} \right\} \frac{DT}{DR} = \frac{100}{A}$$

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

▪ **Traçage de la droite de concordance**

4 - APPLICATIONS

4. 1 TESTS DE STERILITE

4. 1. 1 Milieux de culture

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

4. 1. 2 Tampons

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

4. 2 TESTS D'EFFICACITE

Nous avons fait des tests préliminaires avec les milieux et tampon stériles ainsi qu'avec les substances de référence.

Nous avons :

- régénéré le milieu de culture et laissé en surfusion entre 45 et 50°C.
- préparé la suspension de germes avec le milieu de culture
- coulé sur 3 à 5 boites de pétri et laissé sécher à la température du laboratoire.
- déposé les disques stériles avec une pince stérile
- chargé les disques 15µl de chaque dilution de la substance de référence
- laissé diffuser 2 heures à la température ambiante
- incubé à l'étuve 37°C pendant 24 heures

4. 3 DOSAGE DES BETA-LACTAMINES

4. 3. 1 Ampicilline

Présentation : poudre pour suspension injectable flacon 1g

Fabrication : 01/2000

Expiration : 02/2004

4. 3. 1. 1 Réactifs

Souche test : *Escherichia coli* ATCC 25922

Solvant : Tampon₃ pH 7

Diluant : eau distillée stérile

Milieu : AM₂

Eau physiologique stérile

4. 3. 1. 2 Mode opératoire

- Préparation suspension de germes

Elle se fait extemporanément, nous avons travaillé avec 5ml d'eau distillée stérile et nous avons comparé le trouble avec le tube de Mac farland 0,5

- Préparation gamme de dilution :

- *Etalon* :

$$m = 13,5$$

$$C = 1200$$

$$V = 10$$

T = 890

Nous avons pesé 13,5mg de poudre d'ampicilline référence que nous avons dissout dans 10ml de tampon. Nous avons fait une dilution au $1/10^{\text{ème}}$ puis $1/2$ en $1/2$ pour avoir la gamme [60 – 30 – 15 – 7,5 – 3,75] $\mu\text{g/ml}$

- *Antibiotiques à doser*

Nous avons pesé 13,5mg d'ampicilline et nous avons fait une dilution au $1/10^{\text{ème}}$ puis $1/2$ en $1/2$ pour avoir la même gamme que l'étalon.

4. 3. 2 Amoxicilline

Tableau IV : Formes d'Amoxicilline dosées

Antiseptiques	Formes	Fabrication	Expiration
Amoxicilline	Gélules 500mg	11/2002	10/2005
	Sirop 250mg	07/2007	16/2005
	Injectable 1g	01/2000	0/2004

4. 3. 2. 1 Réactifs

Souche test : *Escherichia coli* ATCC 25922

Solvant : tampon₁ pH 6

Diluant : eau distillée stérile

Milieu : AM₂

4. 3. 2. 2 Mode opératoire

Préparation gamme de dilution :

- *Etalon :*

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

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

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

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

Nous avons pesé 73,56 mg de substance de référence que nous avons dissout dans 5ml de solvant.

Nous avons fait des dilutions au $1/10^e$, au $1/8^e$ puis $1/2$ en $1/2$ pour avoir une gamme : [80 – 40 – 20 – 10 – 5] $\mu\text{g/ml}$

- *Antibiotiques à doser*

Nous avons pesé :

73,56mg de poudre d'amoxicilline gélule et injectable ;

147,12mg de poudre pour suspension buvable que nous avons dissout dans 5ml de solvant (sirop et gélule) et dans 10ml de solvant (injectable).

Nous avons fait des dilutions au $1/10^e$, au $1/8^e$, puis $1/2$ en $1/2$ pour avoir la même gamme que l'étalon.

4. 4 DOSAGE DES CYCLINES**Tableau V** : Formes tétracyclines dosées

Antibiotiques	Formes	Fabrication	Expiration
Tétracyclines	Gélule 250mg	09/2001	08/2004
	Pommade dermique 3%	04/2002	01/2005
	Pommade ophtalmique 1%	05/2001	04/2004

4. 4. 1 Tétracycline gélule 250mg

4. 4. 1. 1 Réactifs

Souche test : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Solvant : tampon₄ pH 4,5

Diluant : tampon₄ pH 4,5

Milieu : AM₁

4. 4. 1. 2 Mode opératoire

Préparation gamme de dilution

- *Etalon*

C = 1600 μ g/ml

T = 1009 μ g/mg

V = 10ml

m = 15,86mg

Nous avons pesé 15,86 mg de poudre de tétracycline référence que nous avons dissout dans 10ml de solvant. Ensuite nous avons fait des dilutions au 1/10^e puis 1/2 en 1/2 pour avoir la gamme [80 – 40 – 20 - 10 – 5] μ g/ml

- *Antibiotiques à doser :*

Nous avons dissout 15,86 mg de poudre de tétracycline gélule dans 10ml de solvant et nous avons fait des dilutions au 1/10^e puis ½ en ½ pour avoir la même gamme que l'étalon.

4. 4. 2 Tétracyclines pommades

4. 4. 2. 1 Principe

Le dosage de la tétracycline pommade est basé sur l'extraction par un mélange éther de pétrole / HCl 0,01N. L'extrait obtenu après avoir subi différentes dilutions est mis en contact avec une suspension bactérienne (*Staphylococcus aureus*). Après incubation les diamètres d'inhibition sont calculés en vue de déterminer le titre.

4. 4. 2. 2 Réactifs

Souche test : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Solvant : éther de pétrole

Diluant : HCl 0,01N

Milieu : AM₁

4. 4. 2. 3 Mode opératoire

- Extraction

Nous avons :

- dissout 1g de pommade dans 50ml d'éther de pétrole
- laissé le mélange dans le bêcher jusqu'à dissolution complète de la graisse
- transvasé le contenu dans l'ampoule à décanter et ajouté successivement 20ml de HCl 0,01N par ajout de 5ml.

- mélangé, laissé décanter et fait des extractions successives pour avoir la solution mère.

- Dilution :

A partir de la solution mère (20ml) nous avons fait des dilutions successives.

Pommade 3%

Dans 20ml de solvant nous avons 30mg de principe actif.

Dans 1ml —————→ 1500µg de tétracycline

Nous avons fait une dilution au $1/10^e$ puis $1/2$ en $1/2$ pour avoir la gamme [75 – 37,5 – 18,75 – 9,375 – 4,687]µg/ml.

Pommade 1%

Dans 20ml de solvant nous avons 10mg de principe actif

Dans 1ml —————→ 1000µg de tétracycline

Nous avons fait des dilutions au $1/10^e$ puis $1/2$ en $1/2$ pour avoir la gamme [50 – 25 – 12,5 – 6,75 – 3,125] µg/ml.

4. 5 DOSAGE DES AMINOSIDES

4. 5. 1 Amikacine

Forme : poudre amiklin injectable 250mg

Fabrication : 01/2000

Expiration : 07/2004

4. 5. 1. 1 Réactifs

Souche test : *Escherichia coli* ATCC 25922

Solvant : eau distillée stérile

Diluant : eau distillée stérile

Milieu : AM₁₁

4. 5. 1. 2 Mode opératoire

- Préparation gamme de dilution :

- *Etalon*

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

$$T = 750\mu\text{g/mg}$$

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

$$m = 21,3\text{mg}$$

Nous avons dissout 21,3mg de poudre d'amikacine référence dans 10ml solvant. Nous avons fait des dilutions au $1/10^e$ puis $1/2$ en $1/2$ pour avoir une gamme [80 – 40 – 20 – 10 – 5].

- *Antibiotique à doser*

Nous avons dissout 21,3mg poudre amikacine 250mg dans 10ml solvant. Nous avons fait des dilutions au $1/10^e$ puis $1/2$ en $1/2$ pour avoir la même gamme que l'étalon.

4. 5. 2 Gentamicine

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

Fabrication : 09/2001

Expiration : 09/2004

Lot : WBL 692/01/01

4. 5. 2. 1 Réactifs

Souche test : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Solvant : tampon₃ pH 8

Diluant : tampon₃ pH 8

Milieu : AM₁₁

4. 5. 2. 2 Mode opératoire

- Préparation gamme de dilution

- *Etalon*

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

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

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

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

Nous avons dissout 0,97mg dans 10ml de solvant et nous avons fait des dilutions au 1/10^e puis 1/2 en 1/2 pour avoir la gamme [80 – 40 – 20 – 10 – 5]μg/ml.

- *Antibiotique à doser*

Nous avons mélangé 2ml de gentamicine (80mg) avec 8ml de solvant. Nous avons fait une dilution au 1/100^e puis 1/2 en 1/2 pour avoir la gamme [80 – 40 – 20 – 10 – 5]μg/ml.

4. 6 DOSAGE MACROLIDES (ERYTHROMYCINE)

Forme : comprimé 500mg

Fabrication : 05/2001

Expiration : 04/2004

4. 6. 1 Réactifs

Souche test : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Solvant : méthanol

Diluant : tampon₃ pH 8

Milieu : AM1

4. 6. 2 Mode opératoire

- Préparation gamme de dilution :

- *Etalon*

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

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

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

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

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

- *Antibiotique à doser*

Nous avons dissout un comprimé d'Erythromycine 500mg dans 10ml de solvant. Nous avons fait des dilutions au $1/10^e$ puis $1/2$ en $1/2$ pour avoir la même gamme que l'étalon.

4. 7 DOSAGE SULFAMETHOXAZOLE + TRIMETHOPRIME **(COTRIMOXAZOLE)**

Tableau VI : Formes cotrimoxazole dosées

Antibiotique	Formes	Fabrication	Expiration
Cotrimoxazole	Comprimé 400 + 80mg	01/2001	05/2004
	Sirop 200 + 40mg	01/2002	12/2004

4. 7. 1 Réactifs

Souche test : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Solvant : méthanol

Diluant : méthanol

Milieu : MH

4. 7. 2 Mode opératoire

- Préparation gamme de dilution

• *Etalon*

$$\left. \begin{array}{l} C_1 = 7600\mu\text{g/ml (Sulfaméthoxazole)} \\ C_2 = 15200 \mu\text{g/ml (Triméthoprime)} \end{array} \right\} C = 91200\mu\text{g/ml}$$

$$V = v_1 + v_2 = 20\text{ml}$$

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

Nous avons dissout 76mg de sulfaméthoxazole dans 10ml solvant et 15,2mg triméthoprime dans 10ml solvant.

Nous avons fait des dilutions au $1/100^\circ$ puis $1/2$ en $1/2$ pour avoir la gamme

$[76/15,2 - 38/7,6 - 19/3,8 - 9,5/1,9 - 4,75/0,95]\mu\text{g/ml}$.

- *Antibiotique à doser*

- Pour les comprimés nous avons dissout 91,2mg de poudre dans 20ml de méthanol, nous avons fait des dilutions au $1/100^e$ puis $1/2$ en $1/2$ pour avoir même la gamme qu l'étalon.
- Pour le sirop nous avons mélangé 1ml de suspension avec 10ml de méthanol. Nous avons fait des dilutions au $1/100^e$, au $1/10^e$ puis $1/2$ en $1/2$ pour avoir la même gamme que l'étalon.

4. 8 VALIDATION DES METHODES DE DOSAGE

4. 8. 1 Répétabilité

Nous avons réalisé les tests de répétabilité en faisant chaque dosage plusieurs fois (au moins 3) dans un court instant. Nous avons incubé à 37°C pendant 24 heures.

4. 8. 2 Reproductibilité

Nous avons réalisé les tests de reproductibilité en effectuant chaque test au moins trois fois sur trois semaines (9 tests), soit un test par semaine. Au bout de trois semaines nous avons comparé les résultats obtenus pour chaque test. Nous avons travaillé en changeant de techniciens et de matériels ; tous les appareils utilisés sont calibrés et les tests sont différés dans le temps. Nous avons incubé à 37°C pendant 24 heures.

RESULTATS

ET COMMENTAIRES

1 - RESULTATS DES TESTS PRELIMINAIRES

1. 1 TESTS DE STERILITE

1. 1. 1 Milieux de culture

Au bout de 24 heures d'incubation à l'étuve 37°C nous n'avons constaté aucune pousse de bactéries sur les milieux de culture. Nous pouvons conclure que les milieux étaient stériles.

1. 1. 2 Tampons

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

1. 2 TESTS D'EFFICACITE

Au bout de 24 heures d'incubation nous avons noté des diamètres d'inhibition avec les dilutions que nous avons utilisées pour le dosage. Ceci nous a permis de dire que les références, utilisées sont actives sur les souches de bactéries tests, peuvent être employées lors des dosages.

1. 3 RESULTATS DES DOSAGES

1. 3. 1 Ampicilline

Tableau I: test d'activité de l'ampicilline

Concentrations (µg/ml)		60	30	15	7,5	3,75
		Diamètres d'inhibition (mm)				
Antibiotiques	Référence	20	17	15,5	12	09
	Échantillon	19	17	15	11,5	08

Nous avons noté que la référence et l'échantillon d'ampicilline testés ont presque donné les mêmes diamètres.

- Détermination moyenne diamètres inhibition

E = moyenne diamètres d'inhibition référence

D = moyenne diamètres d'inhibition échantillon

$$E = \frac{\sum E_i}{5} = \frac{20+17+15,5+12+9}{5} = 14,7$$

E = 14,7mm

$$D = \frac{\sum D_i}{5} = \frac{19 + 17 + 15 + 11 + 8}{5} = 14,1$$

D = 14,1 mm

- Détermination dose réelle

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

DR = dose réelle

DT = dose mentionnée sur la forme pharmaceutique

$$DR = \frac{14,1}{14,7} \times 1000 = 959,18$$

$$DR = 959,18 \text{ mg}$$

- **Détermination de l'activité**

$$A\% = \frac{DR}{DT} \times 100 = \frac{959,18}{1000} \times 100 = 95,92$$

$$A = 95,92\%$$

1. 3. 2 Résultats des autres dosages

Tableau II: diamètres d'inhibition des différentes formes de cotrimoxazole

Concentration (µg/ml) cotrimoxazole	76/15,2	38/7,6	19/3,8	9,5/1,8	4,7/0,9
	Diamètre d'inhibition (mm)				
Référence	30	28	25	14	10
Comprimés	28	26	24	14	12
Sirop	28	25	14	12	10

Le tableau montre une différence des diamètres d'inhibition entre les différentes formes de cotrimoxazole.

Tableau III: diamètres d'inhibition du dosage de l'érythromycine

Concentration (µg/ml) Erythromycine	50	25	12,5	6,25	3,12
	Diamètre inhibition (mm)				
Référence	20	19	17	14	10
Comprimé	19	18	16	13	10

Nous avons noté une similitude entre les différents résultats.

Tableau IV: résultats des tests de l'amoxicilline, la tétracycline, l'amikacine et la gentamicine

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)		80	40	20	10	05
		Diamètres inhibition (mm)				
Amoxicilline	Référence	20	19	18	14	10
	Gélule	21	20	19	15	11
	Sirop	19	18	17	15	10
	Injectable	19	17	16	12	08
Tétracycline	Référence	26	24	22	18	16
	Gélule	25	23	20	18	14
	Pommade 1%	25	22	20	15	10
	Pommade 3%	25	23	21	16	12
Amikacine	Référence	23	21	20	16	13
	Amiklin	23	21	19	15	14
Gentamicine	Référence	22	20	18	14	10
	Injectable	24	22	20	17	14

Le tableau montre que pour une même concentration les tétracyclines ont donné les plus fortes concentrations et l'amoxicilline a donné les plus faibles concentrations.

Ces différents résultats nous ont permis de tracer les courbes de concordance suivantes et de calculer les doses réelles ainsi que les activités des différents antibiotiques testés.

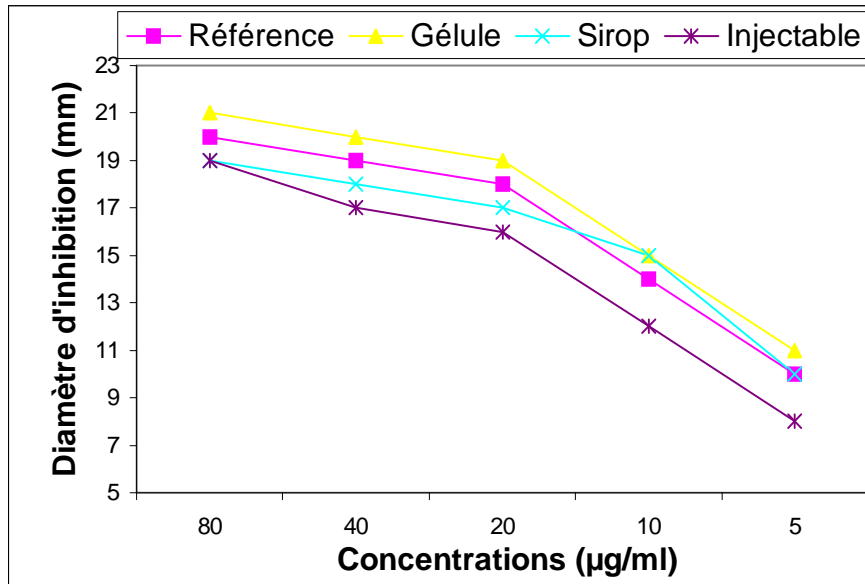


Figure 1 : profil du dosage des différentes formes de cotrimoxazole avec *Staphylococcus aureus*

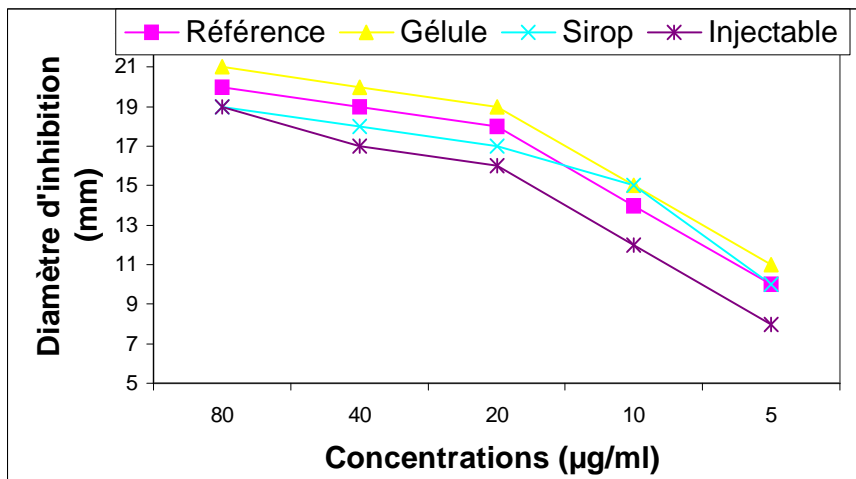


Figure 2 : profil du dosage des différentes formes d'Amoxicilline avec *Escherichia coli*

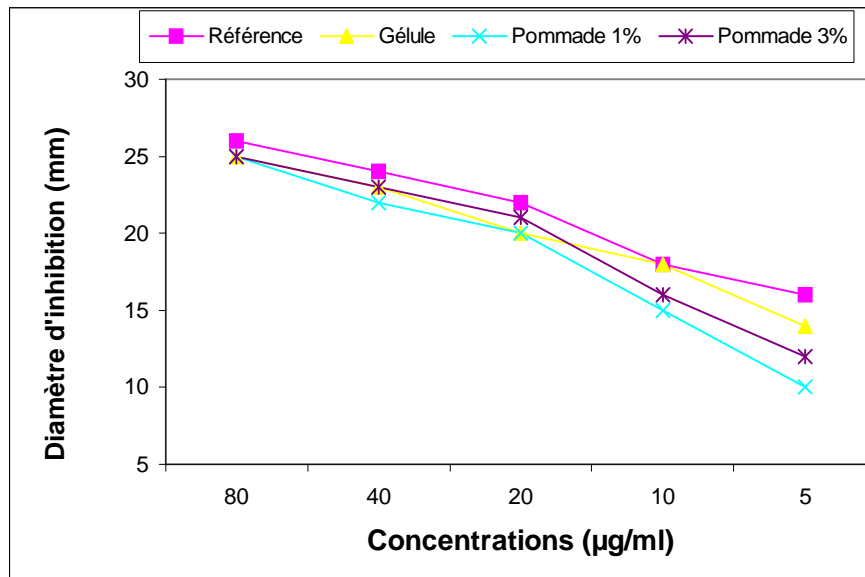


Figure 3 : profil du dosage des différentes formes de tétracyclines avec *Staphylococcus aureus*

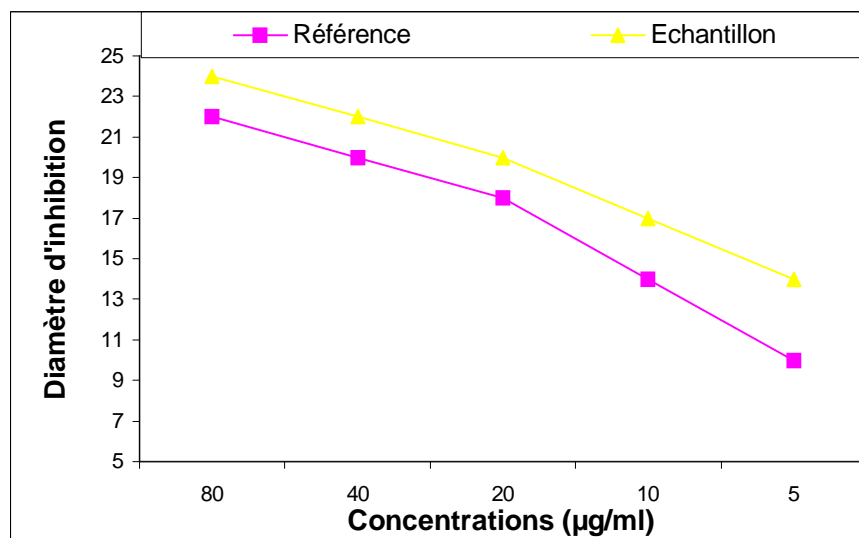


Figure 4 : profil du dosage de la Gentamicine avec *Staphylococcus aureus*

Nous avons noté sur la courbe que l'échantillon de gentamicine est plus actif que la référence.

1. 3. 3 Doses réelles et activités des antibiotiques

Tableau V: doses réelles et activités des différents antibiotiques dosés

Antibiotiques à doser		E (mm)	D (mm)	DR (mg)	A (%)
Ampicilline	Référence	14,7			
	Injectable		14,1	959,18	95,92
Amoxicilline	Référence	16,2			
	Gélule		17,2	530,9	106,2
	Sirop		15,8	243,8	97,53
	Injectable		14,4	888,9	88,89
Tétracycline	Référence	21,2			
	Gélule		20	235,8	94,32
	Pommade 1%		18,4	0,87	87
	Pommade 3%		19,4	2,75	91,67
Amikacine	Référence	18,6			
	Injectable		18,4	247,3	98,92
Gentamicine	Référence	16,8			
	Injectable		19,4	92,32	115,48
Erythromycine	Référence	16			
	Comprimé		15,2	475	95
Cotrimoxazole	Référence	21,4			
	Comprimé		20,8	466,54	97,19
	Sirop		17,8	199,63	83,18

E = moyenne des diamètres d'inhibition de la référence

D = moyenne des diamètres d'inhibition de l'échantillon
 DR = dose réelle
 A = activité

3- RESULTATS DE LA VALIDATION

3.1 RESULTATS DES DIFFERENTS ESSAIS

Tableau VI : diamètres d'inhibition obtenus avec l'ampicilline au cours de différents essais

Concentration (µg/ml)	60	30	15
	Diamètres inhibition (mm)		
Essai 1 (S₁ = j₁)	20 – 19 – 18	17 – 19 – 17	15,5 – 16 – 14
Essai 2 (S₂ = j₈)	19 – 20 – 20	14 – 15 – 15	14 – 15 – 15
Essai 3 (S₃ = j₁₅)	20 – 19 – 20	15 – 16 – 17	16 – 15 – 16

Nous avons noté une ressemblance entre les valeurs des différents essais.

Tableau VII : diamètres d'inhibition obtenus avec l'érythromycine au cours des différents essais

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	50	25	12,5
	Diamètres inhibition (mm)		
Essai 1 ($S_1 = j_1$)	20 – 21 – 20	19 – 18 – 19	17 – 17 – 18
Essai 2 ($S_2 = j_8$)	19 – 20 – 20	19 – 19 – 20	16 – 18 – 17
Essai 3 ($S_3 = j_{15}$)	19 – 21 – 20	20 – 19 – 18	17 – 16 – 16

Tableau VIII: diamètres d'inhibition obtenus avec le cotrimoxazole au cours des différents essais

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	76/15,2	38/7,6	19/3,8
	Diamètres inhibition (mm)		
Essai 1 ($S_1 = j_1$)	30 – 32 – 30	28 – 28 – 28	25 – 26 – 26
Essai 2 ($S_2 = j_8$)	30 – 32 – 31	28 – 27 – 29	25 – 26 – 26
Essai 3 ($S_3 = j_{15}$)	30 – 30 – 30	28 – 28 – 28	25 – 24 – 25

Tableau IX : diamètres d'inhibition obtenus avec l'amoxicilline au cours des différents essais

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	80	40	20
Essais	Diamètres inhibition (mm)		
Essai 1 ($S_1 = j_1$)	20 - 19 - 19	19 - 17 - 19	18 - 18 - 17
Essai 2 ($S_2 = j_8$)	18 - 20 - 19	18 - 17 - 18	18 - 18 - 16
Essai 3 ($S_3 = j_{15}$)	19 - 19 - 18	19 - 18 - 17	18 - 17 - 18

Tableau X : diamètres d'inhibition obtenus avec la tétracycline au cours des différents essais

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	80	40	20
Essais	Diamètres inhibition (mm)		
Essai 1 ($S_1 = j_1$)	26 - 25 - 24	24 - 23 - 24	22 - 22 - 23
Essai 2 ($S_2 = j_8$)	26 - 26 - 25	24 - 24 - 24	21 - 22 - 22
Essai 3 ($S_3 = j_{15}$)	26 - 25 - 25	23 - 24 - 23	22 - 23 - 22

Tableau XI : diamètres d'inhibition obtenus avec l'amikacine au cours des différents essais

Concentration ($\mu\text{g/ml}$) Essais	80	40	20
	Diamètres inhibition (mm)		
Essai 1 ($S_1 = j_1$)	23 – 23 – 22	21 – 20 – 21	20 – 19 – 20
Essai 2 ($S_2 = j_8$)	23 – 22 – 23	22 – 21 – 20	20 – 20 – 20
Essai 3 ($S_3 = j_{15}$)	23 – 22 – 23	22 – 21 – 21	19 – 20 – 20

Tableau XII : diamètres d'inhibition obtenus avec la gentamicine au cours des différents essais

Concentration ($\mu\text{g/ml}$) Essais	80	40	20
	Diamètres inhibition (mm)		
Essai 1 ($S_1 = j_1$)	22 – 23 – 22	20 – 20 – 22	19 – 18 – 18
Essai 2 ($S_2 = j_8$)	24 – 22 – 23	21 – 20 – 21	18 – 18 – 20
Essai 3 ($S_3 = j_{15}$)	22 – 23 – 23	20 – 21 – 20	18 – 18 – 18

Chaque série de tests (3 tests) correspond à un test de répétabilité qui a été effectué le même jour successivement dans un court instant, tandis que les différentes séries (9 tests) correspondent à des tests de reproductibilité qui ont été effectués en différé dans le temps.

Nous avons noté une similitude entre les différents résultats obtenus ●

$S_1 = \text{semaine 1} \quad \longleftrightarrow \quad J_1 = 1^{\text{er}} \text{ jour}$
 $S_2 = \text{semaine 2} \quad \longleftrightarrow \quad J_8 = 8^{\text{ème}} \text{ jour}$
 $S_3 = \text{semaine 3} \quad \longrightarrow \quad J_{15} = 15^{\text{ème}} \text{ jour}$

Ces différents résultats nous ont permis de faire une comparaison avec les résultats du 1^{er} dosage à travers les courbes suivantes.

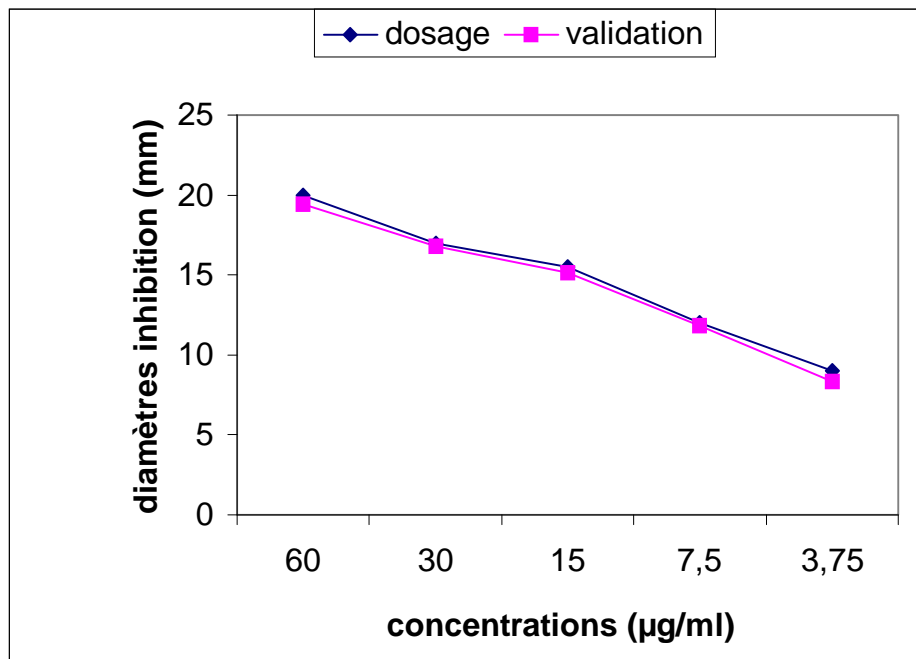


figure 5 : courbes comparatives du dosage et de la validation de l'ampicilline

2

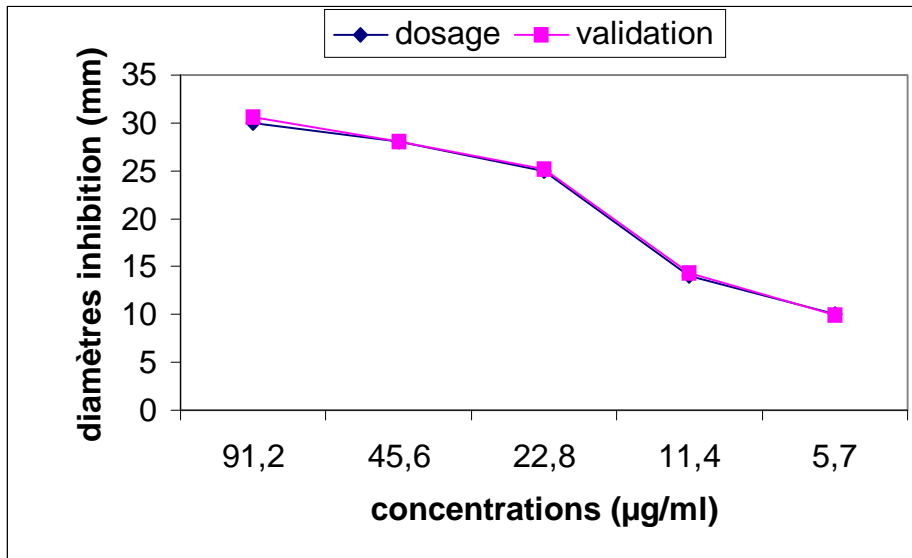


figure 6 : courbes comparatives du dosage et de la validation du cotrimoxazole

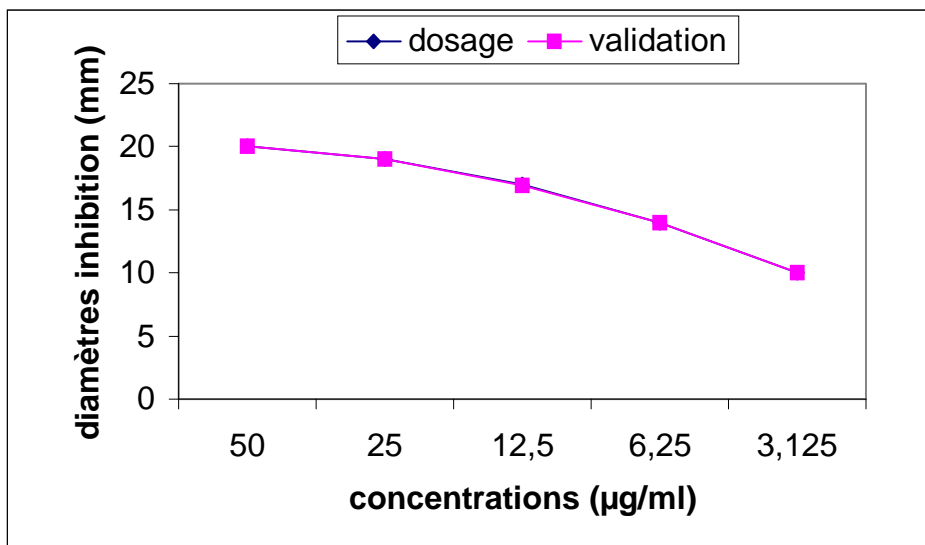


figure 7 : courbes comparatives du dosage et de la validation de l'érythromycine

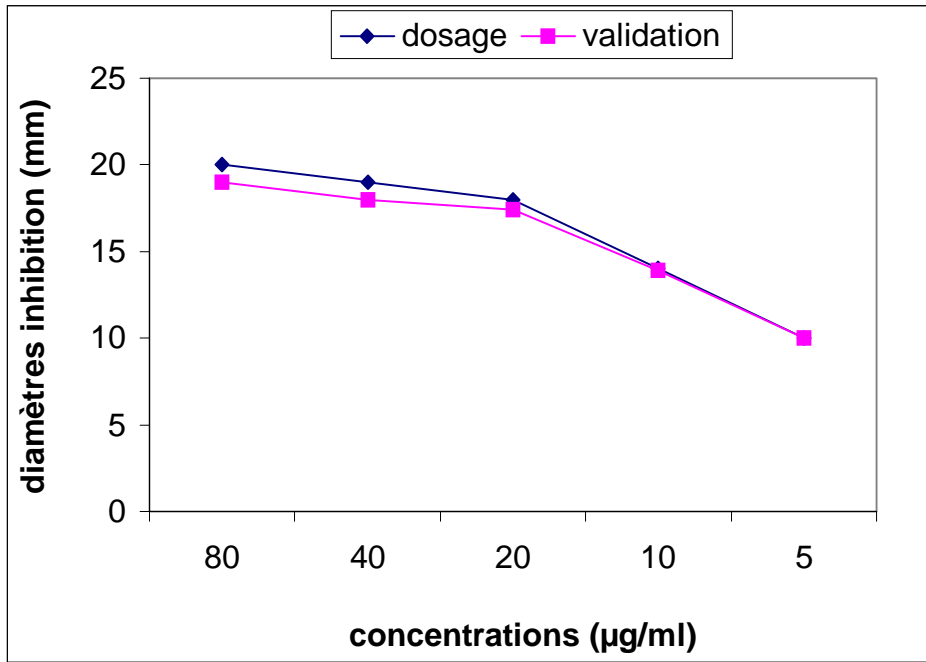


figure 8 : courbes comparatives du dosage et de la validation de l'amoxicilline

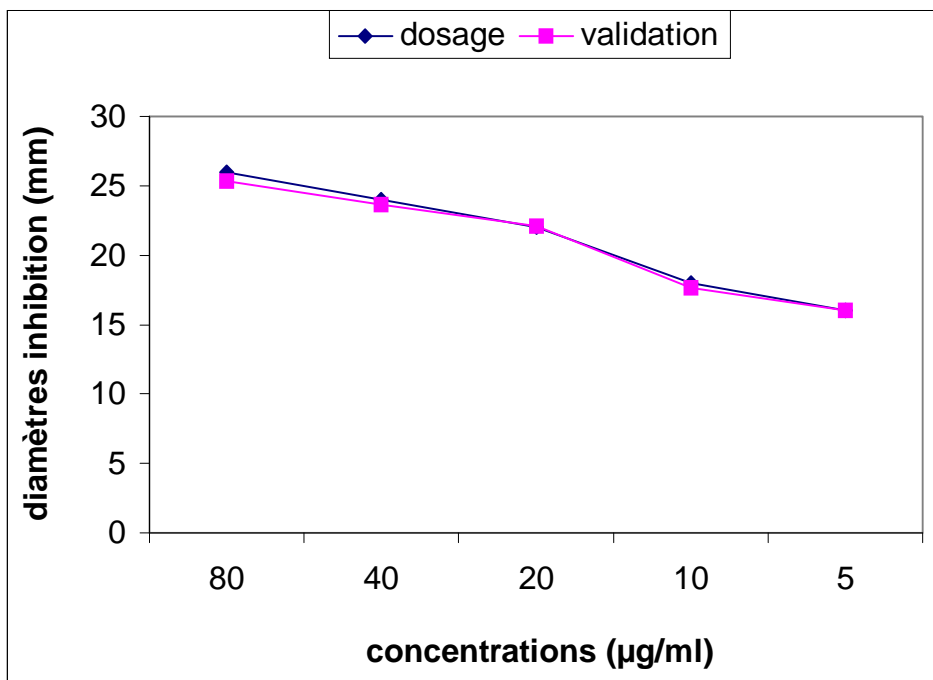


figure 9 : courbes comparatives du dosage et de la validation de la tétracycline

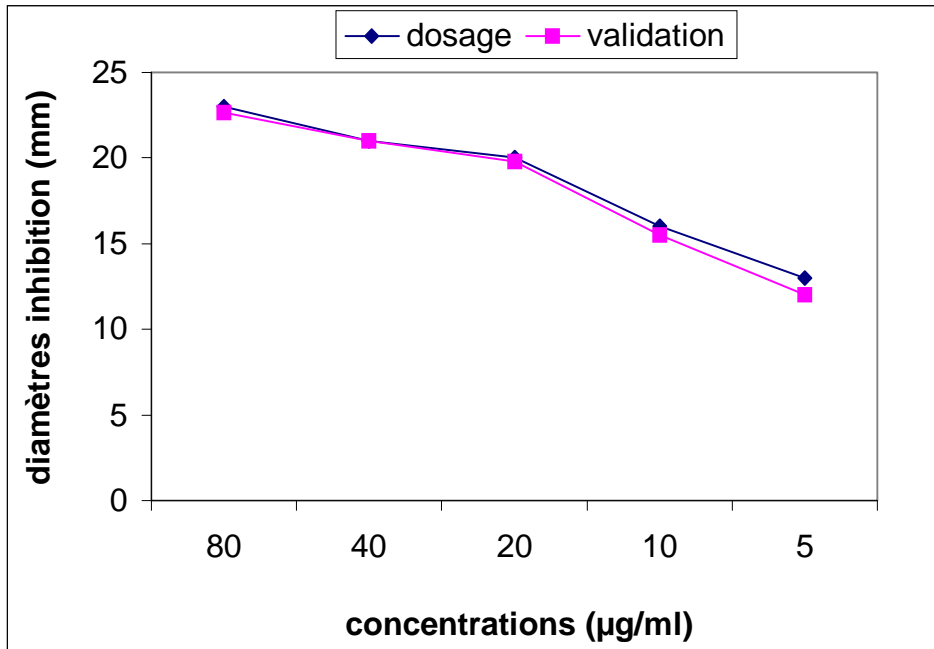


figure 10 : courbes comparatives du dosage et de la validation de l'amikacine

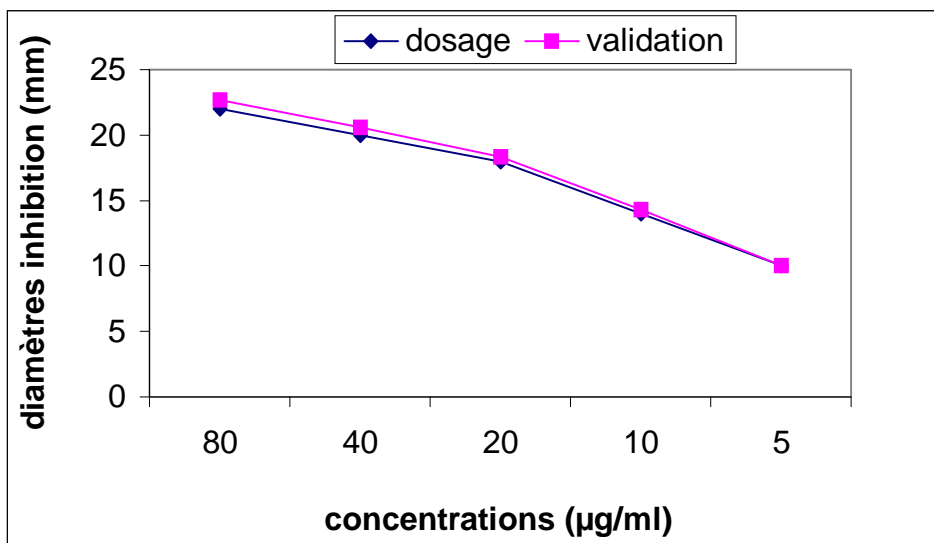


figure 11: courbes comparatives du dosage et de la validation de la gentamicine

Ces différentes courbes confirment les résultats des tableaux précédents. En effet nous avons noté qu'il n'existait presque aucune différence entre les résultats du dosage et ceux de la validation. Nous avons des courbes parfaitement superposables qui confirment la validité de la méthode.

3.2 CALCUL DES VARIABLES

- Moyenne, écart type, écart type moyen et coefficient de variation

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

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

x_i = chaque valeur n = nombre total de valeurs

S = écart-type m = moyenne

Coefficient de variation = $\mathbf{CV} = S / m$

Écart type moyen = $\mathbf{Sm} = \frac{S}{\sqrt{n}}$

Tableau XIV : Résultats du calcul des paramètres de la validation

Antibiotiques	m (mm)	S	CV (%)	Sm	Résultats
Ampicilline	17,2	1,75	10,19	0,59	Validé
Amoxicilline	18,15	0,65	3,5	0,21	Validé
Tétracycline	23,74	1,31	5,54	0,44	Validé
Amikacine	21,14	1,18	5,58	0,39	Validé
Gentamicine	20,51	1,77	8,62	0,59	Validé
Sulfamide + triméthoprime	27,92	2,18	7,8	0,73	Validé
Erythromycine	18,63	1,3	6,96	0,43	Validé

m = moyenne des diamètres d'inhibition

S = écart type

Sm = écart type moyen

CV = coefficient de variation

DISCUSSION

1- CHOIX DE LA METHODE DE DOSAGE

Le principe du dosage microbiologique des antibiotiques est le même quelque soit l'antibiotique à doser, mais la méthodologie varie d'un antibiotique à l'autre. En effet, les conditions optimales de dosage dépendent des caractéristiques de l'antibiotique et sont influencées par divers facteurs.

Il s'agit (**2, 5, 7**) :

- du milieu gélosé : dont le choix est primordial pour la qualité du dosage. La composition et surtout le pH du milieu de culture interfèrent avec l'activité de l'antibiotique, sa diffusion et la croissance de la souche bactérienne. Il y a aussi l'épaisseur du milieu gélosé (3- 4mm)
- de la souche de bactérie test : qui doit avoir une grande sensibilité vis à vis de l'antibiotique à doser, une croissance rapide et une bonne conservation dans du sang ou de la glycérine à -80°C .
- Solvant et diluant : il faut un tampon pH convenable à chaque antibiotique.
- Les antibiotiques : ils sont caractérisés par leur conservation, leur poids moléculaire et le pH de la solution mère. En effet, si ces conditions ne sont pas respectées, nous pouvons être confronté à des problèmes de solubilité de la poudre titrée ainsi qu'à des problèmes de diffusion.

1.1 AVANTAGES (7, 11)

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, peu onéreuse et d'exécution facile par le personnel technique. Elle s'applique au dosage de tous les antibiotiques et mesure l'activité antibactérienne de l'échantillon en prenant en compte les éventuels métabolites actifs.

1.2 LIMITES (5, 7, 11)

Elle constitue souvent une méthode de réalisation longue, avec un délai de réponse d'environ 24 heures mais qui peut être raccourci à 4 heures dans certains cas.

Sa précision est relativement modeste (de l'ordre de 15%) et sa spécificité est conditionnée par la présence dans l'échantillon d'autres antibiotiques 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 indicatrice, mais des concentrations de 0,03 mg/l sont acceptables avec certaines espèces de bactéries.

2. ANALYSE DES RESULTATS

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 (11).

En effet, notre étude a consisté à faire une validation du dosage microbiologique des antibiotiques par diffusion sur gélose, alors que les autres études étaient basées sur la détermination de l'activité d'un médicament dans les liquides biologiques (sang, sérum, expectorations etc).

Il est ressorti de notre étude que parmi les antibiotiques utilisés pour le dosage presque la majorité était active sur les germes testés (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) à des concentrations différentes.

Les antibiotiques que nous avons utilisés pour notre étude appartiennent à plusieurs familles. Il s'agit des :

- **Béta-lactamines** (ampicilline, amoxicilline)
- **Cyclines** (tétracycline)
- **Aminosides** (amikacine, gentamicine)

- **Macrolides** (érythromycine)
- **Sulfamide + Triméthoprime** (cotrimoxazole).

Mais aussi à diverses formes pharmaceutiques. En effet nous avons travaillé avec :

- Les **comprimés** (cotrimoxazole, érythromycine)
- Les **gélules** (tétracycline, amoxicilline)
- Les **sirops** (amoxicilline, cotrimoxazole)
- Les **formes ingectables** (ampicilline, amoxicilline, gentamicine, amikacine)
- Les **pommades** (tétracycline).

A l'issue de nos dosages nous avons eu différents résultats selon la famille d'antibiotique dosée mais aussi selon la forme pharmaceutique.

2.1 ACTIVITE DES ANTIBIOTIQUES SUR LES SOUCHES TESTEES

2.1.1 Sur *Escherichia coli* ATCC 25922

- **Ampicilline** : Nous avons travaillé avec une substance de référence et un échantillon. Le dosage a nécessité une gamme étalon de 5 concentrations [60 – 30 – 15 - 7,5 - 3,75]µg/ml qui a donné les résultats du tableau I.

Dans la littérature, les auteurs **Gherna R** et **Pienta P (16)** ont donné un intervalle d'activité des antibiotiques. En effet pour l'ampicilline, les diamètres d'inhibition enregistrés doivent être compris entre (16 – 22) mm pour affirmer que le médicament contient un principe actif. Dans nos tests, seules les concentrations de [60 – 30 – 15] µg/ml ont donné pour l'étalon et pour l'échantillon des diamètres d'inhibition compris dans cet intervalle.

Ainsi les concentrations de [7,5 – 3,75] µg/ml ont donné des diamètres d'inhibition mais ne sont pas actives. La concentration de 15 µg/ml est la plus faible concentration active sur *Escherichia coli* et correspond à la dose moyenne d'activité de l'ampicilline. La pharmacopée européenne donne pour les dosages une limite de

confiance comprise entre 95 et 105% (**28, 29**). L'ampicilline dosé a une dose réelle de 959,18mg inférieure à la dose mentionnée sur la forme pharmaceutique 1000 mg. Mais nous avons noté une activité de 95,92% qui est comprise dans la limite de confiance. L'ampicilline testé a une bonne activité et peut être utilisé en thérapeutique.

- **Amoxicilline** : Nous avons travaillé avec les formes gélule, sirop et injectable [80 – 40 – 20 – 10 – 5] $\mu\text{g/ml}$

Les auteurs **Ghera R** et **Pienta P (16)** ont proposé un intervalle d'activité de (15 – 22) mm, dans notre étude seules les concentrations de [80 – 40 – 20] $\mu\text{g/ml}$ ont donné des diamètres d'inhibition compris dans cet intervalle. La valeur de 20 μg est la plus faible concentration active sur *Escherichia coli* et correspond à la dose moyenne d'activité de l'amoxicilline.

Nos tests ont révélé pour la référence utilisée, une moyenne des diamètres d'inhibition (16,2 mm) inférieure à celle de la forme gélule (17,2 mm) mais supérieure à celles des formes sirop (15,8 mm) et injectable (14,4 mm).

De même pour la forme gélule la dose réelle (530,9 mg) est supérieure à la dose mentionnée sur la forme pharmaceutique (500 mg) et son activité est de 106,2% donc hyper activité si on tient compte de la limite de confiance qui est de 105% maximum.

Pour la forme sirop la dose réelle (243,8) mg est inférieure à la dose mentionnée sur la forme pharmaceutique (250) mg et l'activité est de (97,53) et comprise dans la limite de confiance.

Quand à la forme injectable la dose réelle (888,9) mg est inférieure à la dose mentionnée sur la forme pharmaceutique (1000) mg et l'activité est de (88,89%) très inférieure par rapport à la limite de confiance.

En conclusion nous pouvons dire que la forme sirop a une bonne activité et peut être utilisée en thérapeutique.

La forme gélule malgré l'hyper activité que nous avons noté peut être utilisée en thérapeutique sans engendrer une toxicité si l'on tient compte de l'effet du premier passage hépatique et des enzymes de la digestion qui peuvent en partie diminuer son efficacité et ramener son activité à la normale. Elle peut être utilisée en thérapeutique.

La forme injectable a une faible activité mais peut néanmoins être utilisé en thérapeutique et éventuellement donner une efficacité dans le traitement si on se rappelle du fait que la voie veineuse est une voie directe avec une biodisponibilité de 100%.

Amikacine : D'après les résultats que nous avons obtenus et ceux de certains auteurs (**16, 28, 29**), nous avons noté une dose moyenne d'activité de $20\mu\text{g/ml}$. La dose réelle (247,3) mg est inférieure à la dose mentionnée sur la forme pharmaceutique (250) mg, mais nous avons noté une bonne activité (98,92%).

Du moment que nous sommes en présence d'une forme injectable qui ne subit pas l'effet de premier passage dans le foie et les enzymes de la digestion, nous pouvons dire que l'Amiklin 250 mg est active et peut être utilisée en thérapeutique.

2.1.2 Sur *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

- **Gentamicine** : Les études de **Gherma R** et **Pienta P** (**16**) ont donné un intervalle d'activité de (19 – 27) mm qui inclut dans notre gamme d'étude les concentrations de [80 – 40 – 20] $\mu\text{g/ml}$, la dose moyenne d'activité de la Gentamicine est de $20\mu\text{g/ml}$.

Nous avons travaillé avec la Gentamicine injectable 80 mg et nous avons noté pour la référence une moyenne des diamètres d'inhibition (16,8) mm inférieure à la moyenne des diamètres d'inhibition de l'échantillon (19,4) mm. Cette différence peut être liée à la nature de la substance de référence qui peut être instable du fait

d'une mauvaise conservation.

La dose réelle (92,38) mg est supérieure à la dose mentionnée sur la forme pharmaceutique (80) mg et l'activité est de 115,48%.

Si nous avons un problème au niveau de la référence, on peut considérer cette valeur comme normale et utiliser cette forme de Gentamicine en thérapeutique.

Dans le cas contraire, nous devons tenir compte de l'hyper activité et ajuster les doses administrées pour éviter une toxicité surtout chez les enfants qui ont des fonctions hépatiques et rénales immatures.

- **Erythromycine** : Nous avons un intervalle d'activité de (17 – 22) mm qui inclut les concentrations [50 - 25 - 12,5] µg/ml de notre étude. La dose moyenne d'activité de l'érythromycine est 12,5 µg/ml.

Une étude antérieure avait trouvé une dose moyenne d'activité de 5 µg/ml. Ces résultats ne sont pas superposables et peuvent s'expliquer soit par une erreur dans les dosages, soit une apparition d'une résistance de la souche testée vis à vis de l'antibiotique.

La dose réelle (DR) 475 mg est inférieure à la dose mentionnée sur la forme pharmaceutique (DT) 500 mg mais l'activité (A) est de 95% comparable aux résultats de la pharmacopée européenne (28, 29). L'Erythromycine a une bonne activité et peut être utilisée en thérapeutique.

- **Tétracycline** : Nous avons travaillé avec les formes gélule et pommades 1% et 3%. Les résultats que nous avons obtenus ont montré pour la forme gélule une dose réelle 235,8 mg inférieure à la dose mentionnée sur la forme pharmaceutique 250 mg et une activité de 94,32%.

Pour la pommade 1% : DR = 0,87% et A = 87%

Pour la pommade 3% : DR = 2,75% et A = 91,67%

Par comparaison aux résultats fournis par **Gherna R** et **Pienta P (16)**, les doses moyennes d'activité (DMA) sont :

gélule = 20 µg/ml

pommade 1% = 12,5 µg/ml

pommade 3% = 18,75 µg/ml

La différence aux niveaux des doses réelles et des activités peut s'expliquer par la différence au niveau des DMA. En effet avec des concentrations plus fortes nous avons obtenu des diamètres d'inhibition plus grands.

Ainsi malgré la faiblesse des activités, nous avons noté des DMA faibles qui témoignent d'une bonne activité. Les tétracyclines sont donc actives et peuvent être utilisées en thérapeutique.

- **Cotrimoxazole** : Nous avons travaillé avec les formes comprimé et sirop. L'intervalle d'activité noté dans la littérature (**16**) est de (24 – 32) mm et renferme les concentrations de [76/15,2 – 38/7,6 – 19/3,8] µg/ml donc la DMA = 19/3,8 µg/ml. Dans d'autres études la DMA était de 9,5/1,8 µg/ml.

La forme comprimé a une DR = 466,54 mg inférieure à DT = 480 mg la forme sirop a DR = 192,89 mg inférieure à DT = 240 mg.

Leurs activités correspondantes sont de 97,19% et 83,18%.

Nous avons remarqué que la forme comprimé (adulte) est plus active que la forme sirop (pédiatrique).

La forme comprimé est active et peut être utilisé en thérapeutique, par contre la forme pédiatrique infra dosée ne doit pas être utilisée. Si nous devons l'utiliser, il nous faut informer les cliniciens de la dose réelle du produit pour qu'ils puissent ajuster les posologies.

2.2 VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE

Pour valider la méthode de dosage nous avons travaillé avec des paramètres comme la répétabilité (une série de 3 tests dans un court instant par le même manipulateur) et la reproductibilité (3 séries de 3 tests différées dans le temps). Nous avons calculé la

moyenne générale des diamètres d'inhibition pour la référence de chaque produit. Nous avons aussi utilisé les concentrations comprises dans l'intervalle d'activité fournit par **Ghenard R** et **Pienta P (16)** 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. Les variations ne doivent pas excéder 15% de la valeur théorique. Nous avons déterminé l'écart type **S** qui caractérise la précision d'un résultat isolé et permet de calculer le coefficient de variation **CV** et l'écart type moyen **Sm** qui caractérise la précision d'une méthode analytique (**6, 10, 14, 31**).

L'étude des différents critères de la validation ne s'applique pas nécessairement tous à chaque procédure d'analyse. Une note explicative (ref. III / 844 / 87 en final), publiée en Août 1989 par le groupe de travail sur la qualité des médicaments du code de la santé publique (CSP), donne quelques recommandations générales sur la validation analytique (**3**).

En pratique, notre étude s'est limitée à la reproductibilité et à la répétabilité mais ne nous a pas empêchée de déterminer d'autres paramètres (limite de détection, précision, linéarité...). A l'issue de notre dosage nous avons obtenu des écart-types moyens compris entre 0,2 et 0,6 qui caractérisent la précision de la méthode de dosage que nous avons utilisée et par conséquent la diffusion sur gélose.

D'autre part nous avons noté des coefficients de variation compris entre 3 et 10,5%, des études ont montré qu'une méthode de dosage n'est reproductible, répétable et précise que si le coefficient de variation est inférieur à 15%. Nous pouvons conclure, compte tenu des valeurs que nous avons obtenues, que la méthode de dosage microbiologique par diffusion sur gélose que nous avons utilisé pour le dosage de nos antibiotiques est une méthode fiable et valide.

CONCLUSION

La procédure de validation que nous avons utilisée tout au long de cette étude représente le travail minimum devant être réalisé dans un laboratoire afin de garantir un résultat rendu. Il est nécessaire d'effectuer une analyse critique des résultats obtenus de façon à modifier les paramètres de la méthode en fonction des données acquises.

Cependant, la discussion des critères de fiabilité de la méthode ne doit pas exclure d'autres critères qui rentrent en compte lors du choix d'une technique analytique (praticabilité, prix de revient, rapidité de la méthode). Notre étude a utilisé le dosage microbiologique des antibiotiques en particulier la méthode de diffusion en milieu gélosé. En effet la méthode de dosage microbiologique est la seule à évaluer l'activité antibactérienne globale de l'antibiotique et de ses métabolites microbiologiquement actifs.

Le dosage a été effectué sur des produits pharmaceutiques (médicaments) afin de déterminer la qualité du médicament utilisé en thérapeutique, et non dans les produits biologiques qui détermine l'efficacité d'un traitement dans une affection.

Notre travail a porté sur différentes familles d'antibiotiques

- **Béta-lactamines** (Amoxicilline, Ampicilline)
- **Cyclines** (Tétracycline)
- **Macrolides** (Erythromycine)
- **Aminosides** (Amikacine, Gentamicine)
- **Sulfamide et Triméthoprime** (Cotrimoxazole)

Mais aussi sur différentes formes de présentations de ces antibiotiques

- **Comprimés** (Cotrimoxazole, Erythromycine)
- **Gélules** (Tétracycline, Amoxicilline)
- **Injectables** (Amiklin, Gentamicine, Amoxicilline, Ampicilline)
- **Pommades** (Tétracycline)

A l'issue de notre étude nous avons noté des différences d'activités de nos antibiotiques en fonction de la famille mais aussi de la forme testée.

Si nous faisons une moyenne des activités obtenues au sein d'une famille ou d'une forme, nous pouvons classer les antibiotiques de façon décroissante.

En fonction de la famille

Aminosides (107,2%), Bétalactamines (96,73%), Macrolides (95%), Cyclines (91%), Cotrimoxazole (90,18%).

En fonction de la forme pharmaceutique

Injectable (99,8%), gélule et comprimé (98,17%), sirop (90,35%), pommade (89,34%).

Cette classification n'est pas exhaustive et ne concerne que les molécules que nous avons étudiées. Elle pourra être confirmée ou infirmée par des études ultérieures. Ainsi par rapport à la localisation de l'infection et le germe en cause, nous pouvons recommander la forme injectable en thérapeutique pour atteindre plus rapidement l'efficacité dans le traitement.

Les paramètres utilisés pour valider la méthode de dosage et les résultats obtenus surtout coefficient de variation compris entre **3 – 10,5%** nous ont permis de confirmer la validité de la technique de diffusion sur gélose, affirmée et confirmée par des études antérieures.

Notre travail nous a donné des résultats qui nous ont permis d'avoir une idée sur la qualité des médicaments utilisés en thérapeutique. Certains médicaments testés, parfois loin d'avoir une activité de 100%, présentent dans la majorité des cas des activités supérieures à 80% de la dose mentionnée sur la forme pharmaceutique. Ces résultats nous rassurent dans la mesure où nous avons travaillé avec des médicaments génériques utilisés à l'hôpital Aristide Le Dantec.

En effet la politique de santé publique dans nos pays, pour une accessibilité du médicament aux populations les plus démunies et à un moindre prix, par la création des génériques, a entraîné une recrudescence des laboratoires et des médicaments dont la qualité n'est pas toujours assurée. Ainsi cette étude nous a permis d'affirmer que certains médicaments utilisés en thérapeutique même s'ils sont parfois sous-dosés restent actifs dans la majorité des cas.

Dans le domaine du dosage des médicaments, il paraît évident que les résultats obtenus à l'issue de la validation doivent être discutés au coup par coup et qu'il n'existe pas une interprétation universelle de ces données. Ainsi nous pouvons nous poser un certain nombre de questions :

- Vaut-il mieux disposer d'une méthode exacte ou précise ?
- La précision d'une méthode est-elle discutable au regard des molécules dosées.
- Une amélioration des critères de fiabilité de la méthode n'entraînera t-elle pas une surcharge de travail et une majoration des coûts des dosages ?

En fin, la validation d'une méthode analytique doit être considérée comme la première démarche à exécuter lors de la mise en route de toute technique. Elle ne doit pas exclure un contrôle de qualité régulier. Ce dernier permettra quant à lui d'assurer le maintien de la qualité des résultats rendus.

Ces méthodes de dosage et leur validation devraient être obligatoires et élargies aux produits alimentaires et cosmétiques afin d'assurer une meilleure sécurité des consommateurs.

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES

1- AFNOR

Antiseptiques et désinfectants

Recueil de normes françaises 1989 : 159 – 162

2- Anhalt J P, Washington II USA,

Preparation and dosage of antimicrobial solutions.

In : Manual of Clinical Microbiology, Lennette, Sparling et Truant Eds, ASM.
Washington DC, USA, 1980 : 496

3- Azele Ferron et C. et R, 1983

Bactériologie Médicale : à l'usage des étudiants en médecine

12^{ème} Eds 1984 : 11 - 16 ; 24 – 27 ; 122 – 126

4- Baud M, Cohen R, Dumont G, Mercier M, Naudiu C, Vassault A, Chatelain F, Georges P, Jugrand J, Roux A, Ruffié A, Shermman J M

et les membres de la commission « validation de techniques » de la SFBC (1989) évaluation de la limite de détection.

Inf. Scie Biol 15, 157 – 63

5- Barza M, Bruschi J, Bregeron M G, Weinstein L,

Penetration of antibiotics into fibrin loci in vivo.

J Infect Dis, 1974 ; 129 : 73 – 78

6- Baschung – Bertrand M, Beau – Temps R et coll., 1990

Validation Analytique.

Commentaire sur la note explicative. Rapport d'une commission SFSTP, STP, Pharma : 6,
8, 588 – 591

7- Bergogne-Berezin E, Brogard JM

Bases biologiques de l'antibiothérapie

Masson – Paris, 1999 : 77 – 86

8- Chambreuil G, Marmonier A. A

Contrôle de la thérapeutique antibiotique

In : Bactériologie Médicale – Techniques usuelles.

Paris, France 1983 : 269 – 282

9- 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

10- 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 : 15-17

11- Diéye A.

Etude de l'efficacité thérapeutique de différents antibiotiques utilisés dans les infections respiratoires basses

Thèse Pharm : Dakar, 2001, n°10 : 21 – 22

12- Duval J

Classification et mécanisme d'action des agents antibactériens

Dans : Le Minor L Eds bactériologie Médicale

Paris, Médecine-Sciences, Flammarion, 1989 : 273 – 296

13- Duval J, Soussy C J

Abrégé de l'antibiothérapie

4^{ème} Eds Masson, Paris, 1977, 1990 : 75 – 100

14- Dreux C, Metais P, Azzedine Bailly M et coll

Travaux et recommandations de commissions de la société française de biologie clinique (SFBC). Terminologie et concept de base pour apprécier une méthode utilisée en biologie clinique.

Ann- Biol. Clin 1975 : 33, 51 – 60

15- Faurisson F, Rouveix B,

Méthode de dosage des antibiotiques.

La lettre de l'infectiologue. 1996 : XI : 587 – 590

16- Gherna R, Pienta P

Catalogue of bacteria and bacteriophages

ATCC 17th eds, 1989 : 88, 204, 407.

17- Klassen M, Edberg SC

Measurement of antibiotics in human body fluids : techniques and significance. *In : Antibiotics in Laboratory Medicine 4th edition, 1996, Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA : 230 – 295.*

18- Konaté D

Standardisation, optimisation et évaluation d'une microméthode d'étude de la sensibilité des Mycoplasmes urogénitaux.

Thèse Pharm : Dakar 2001, n°84 : 21 – 23

19- Lacroix Y

Analyse clinique, interprétation des résultats par le contrôle statistique.

Masson, Paris, 1973 : 25-30

20- Larpent JP, Sanglier JJ

Biotechnologie des antibiotiques, données générales sur les antibiotiques

Masson – Paris – Milan – Barcelone – Mexico – 1989 : 1-2 ; 12-15 ; 26-27 ; 123

21- Lecompte D

Validation d'une méthode de dosage par chromatographie liquide.

STP Pharma 2 (numéro hors série) 1986 : 843 - 849.

22- Mare L

Contribution à l'assurance de la qualité dans un laboratoire d'analyse : cas du laboratoire de chimie analytique et toxicologique de la faculté de Médecine et Pharmacie.

Thèse Pharm : Dakar, 2001, n°61 : 66 – 68

23- Marmonier A. A

Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques

Dans : Carbonnelle B. et Coll, Bactériologie Médicale : Techniques usuelles

Paris, SIMEP, 1987, 227 – 232

*24- Mesure de l'activité antibactérienne des antibiotiques
bactériologie*

Bactéries des infections humaines

Médecine-Sciences, Flammarion, Paris, 1988 : 596 – 600.

25- Moulin M

Abrégé de pharmacologie

Masson, *paris, 1998 : 115 – 125*

26- Ngom Ng

Etude prospective sur les infections basses communautaires

Thèse Pharm : Dakar, 2001, n°21 : 24 – 49

27- Pharmacopée Européenne

Méthodes de dosage microbiologiques

3^{ème} Eds 1987 : 28 – 33 ; 105 ; 402

28- Pharmacopée Européenne

Méthodes de dosage microbiologiques

3^{ème} Eds 1999 : 56 – 60

29- Pharmacopée Internationale

Normes de qualité (OMS 1981)

3^{ème} Eds, vol.2: 39, 274, 281, 290

30- Pharmacopée Internationale

Normes de qualité (OMS 1988)

3^{ème} Eds, vol.3: 17, 134, 161

31- Pradeau D, Cohen Y

Analyse pratique du médicament

Eds. Méd. Inter. : 115 – 141

32- Reverdy M, Brun Y and Fleurette J

Evolution de la résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques de la souche hospitalière de *Staphylococcus aureus* isolée de 1980 – 1991

1993 *Pathol-Biol* – 41 : 897 – 904

***33- Sabbath LD, Casey JI, Rush PA, Stump LL,
Finland M.***

Rapid micro assay for circulating nephrotoxic antibiotic Antimicrobial.
Agents Chemother 1970 ; 1969 ; 38 – 89.

34- Tec et Doc Lavoisier

Médicaments antibiotiques

AFECT 1992, *Eds. med. Inter. Vol. 2* : 5 – 9 ; 22 – 26 ; 70 – 71 ; 251 ; 287

35- Vallée E, Bergogne – Berezin E

Dosages tissulaires des antibiotiques.

Etude critique. Rev. Fr 2aS, 1989 : 187 : 41 – 45

***36- Vassault A, Baud M, Castanier M, Dumont G, Ingrand J,
Marcier M, Moriu JF, Naudin C***

(commission « validation de techniques ») de la SFBC et le groupe de travail SFBC/Corata « comparaison de techniques » (1992) recommandations pour la comparaison de techniques (document F)

Ann Biol Cliu 50, 727 – 730.

37- Vassault A, Dumont G, Labbé D

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

Le moniteur internat, 1992 : 26 ; 30 – 33

38- Vassault A, Mollard JF, Naudiu C, Dumont G, Azzedine MC, Bailly M

et les membres de la commission « validation de techniques » de la SFBC (1986). Définition et description d'une technique de validation (document C)
Ann Biol Cliv 44, 746 – 55

39- Vassault A, Grafmeyer D, Naudin C, Dumont G, Bailly M, Henry J, Gerhardt MF, Georges P

et les membres de la commission « validation de techniques » de la SFBC (1986).
Protocole de validation de techniques (document B) Ann Biol Cliv 44, 686 – 745.

40- Vassault A, Mollard JF, Naudiu C, Dumont G, Azzedine MC, Bailly M

et les membres de la commission « validation de techniques » de la SFBC (1986).
Dictionnaire des termes à l'usage de la validation de techniques (glossaire) (document A)
Ann Biol Cliv 44, 679 – 685

Serment de galien

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

Ⓓ'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

Ⓓ'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.