



Université Sidi Mohamed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques Fès-Saïss
Département de Chimie

MASTER CHIMIE DES MOLECULES
BIOACTIVES



Soutenance du Mémoire de Fin d'études
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Etude de stabilité de la Rifampicine par la spectrophotométrie UV-VIS.

❖ Présenté par :
Mlle Ouiame RAJI

❖ Encadré par : Pr. Youssef Khabbal
Pr. EL Hadi Lamcharfi

Année Universitaire : 2013-2014

Dédicace

☞ *A mes très chers parents....*

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

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

C'est en lui que je puise sans cesse la force de me battre et c'est lui qui m'a guidé sur ce beau parcours où je franchis une nouvelle étape aujourd'hui. Pour l'investissement que vous avez fait, pour la confiance que vous m'avez témoignée, pour le soutien que vous m'avez donné tout au long de ces années,

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

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

☞ *A mon très cher frère Wadie,*

En témoignage de ma sincère affection et de ma profonde reconnaissance je te dédie ce travail avec mes souhaits de bonheur et de réussite dans ta vie professionnelle.

☞ *A ma très chère sœur Widad,*

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

☞ *A mon cher fiancé,*

Tu m'as toujours soutenu dans les moments difficiles. Ton affection n'a d'égale que ta gentillesse.

Avec mon grand amour, je te dédie ce travail en te souhaitant beaucoup de bonheur et un avenir plein de joie.

À toute ma famille,

Je vous dédie ce travail en vous souhaitant tout le bonheur du monde.

À mes amis (es) et ceux qui me sont chers,

Je vous dédie ce travail avec mes sentiments les plus sincères, en mémoire de tous les moments agréables vécus ensemble.

À toute la promotion 2013/2014 de la faculté des sciences et techniques option : Chimie des Molécules Bioactives.



Remerciements

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet de fin d'étude pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques « Chimie des Molécules Bio actives ».

Je tiens tout d'abord à remercier le directeur du centre hospitalier universitaire Hassan II de Fès de m'avoir accueilli au sein de son établissement.

Je remercie particulièrement Pr AMARTI Amal, chef du laboratoire de m'avoir accepté d'effectuer mon stage de fin d'études dans son laboratoire.

Je remercie le Pr KHABBAL Youssef, pour son encadrement au sein de laboratoire de biochimie (unité de pharmacologie). Sa gentillesse extrême, sa compétence pratique, ses qualités humaines et professionnelles ainsi que sa compréhension à l'égard des étudiants m'inspirent une grande admiration et un profond respect.

Je remercie le Pr LAMCHARFI ELHADI qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour la confiance qu'il m'a accordée et pour ses précieux conseils, sa disponibilité et sa gentillesse qui ont contribué au bon déroulement de ce travail.

Professeur OUAZZANI CHAHDI Fouad, je tiens à vous remercier pour votre accueil dans votre master. Je suis très reconnaissante pour la confiance que vous m'avez accordée. Votre gentillesse, votre disponibilité, et vos encouragements et votre présence pendant les moments difficiles m'ont été indispensables.

Mesdames, Messieurs les jurys je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger mon modeste travail.

SOMMAIRE

➔ INTRODUCTION GENERALE.....	6
➔ PRESENTATION DU LIEU DU STAGE	6

PREMIERE PARTIE PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LA STABILITE DES MEDICAMENTS

I. ETUDE DE STABILITE D'UN MEDICAMENT	8
1. LES CRITERES DE QUALITE D'UN MEDICAMENT	8
2. LES TYPES DE STABILITE MEDICAMENTAUSE	10
3. LESFACTEURS INFLUENCANTS SUR LA STABILITE DES MEDICAMENTS	10
II. CAS DE LA RIFAMPICINE.....	13
1. STRUCTURE DE LA RIFAMPICINE.....	14
2. DESCRIPTION GENERALE DE LA MOLECULE	14
3. ORIGINE ET SYNTHESE DE LA RIFAMPICINE	14
4. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES	16
5. PHARMACOLOGIE	16
6. STABILITE DE LA RIFAMPICINE.....	16

CHAPITRE II : GENERALITES SUR LA TUBERCULOSE ET LES ANTITUBERCULEUX

I. LA TUBERCULOSE :	
1. Généralités.....	18
2. Principe de traitement de la tuberculose	18
3. Les différentes étapes du traitement de la tuberculose.....	18
II. LES ANTITUBERCULEUX :	

1. Introduction	19
2. Classification des antituberculeux	19
3. La posologie des antituberculeux essentiels	20
4. Les actualités existantes	20
5. Les autres antituberculeux majeurs	21
a. L'isoniazide (INH)	21
b. L'éthambutol (EMB)	21
c. Le pyrazinamide (PZA)	22
d. La streptomycine (SMY)	22
6. Les antituberculeux de seconde intention	23
a. La Ciprofloxacine	23

DEUXIEME PARTIE: **PARTIE PRATIQUE**

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES UTILISES POUR L'EDUTE DE LA STABILITE DE LA RIFAMPICINE

I. INTRODUCTION	24
II. MATERIELS	25
1. Appareillage	25
2. Verrerie	25
3. Réactifs	25
III. METHODES D'IDENTIFICATION DE LA RIFAMPICINE	
1. La spectrophotométrie UV visible	26
• Principe	26
• Loi de Beer-Lambert	26
• Les applications de la spectroscopie UV-VIS	27
• Appareillage	27
• Mode opératoire du dosage de la Rif par UV	29

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. RESULTATS ET DISCUSSIONS:

1. Spectre UV de la molécule de la rifampicine	30
2. Etude de stabilité de la RIF au cours du temps et dans l'obscurité	30
3. Effet de la lumière sur la stabilité de la rifampicine	31
4. Effet de la température sur la stabilité de la rifampicine	32
5. Etude de stabilité de la rifampicine dans des différentes solutions.....	35
• Dans l'eau	35
• Dans le sérum salé.....	36
• Dans le sérum glucosé de 5.....	37

II. CONCLUSION	44
➔ BIBLIOGRAPHIE.....	45
➔ ANNEXE	48

LISTE DES FIGURES

FIGURE 2: Organigramme de l'unité de pharmacotoxicologie de CHU- Fès.

FIGURE 3: Structure de la Rifampicine.

FIGURE 4: Structure de l'isoniazide.

FIGURE 5: structure d'Ethambutol.

FIGURE 6: structure du Pyrazinamide.

FIGURE 7: structure de la Streptomycine.

FIGURE 8: structure du Ciprofloxacine.

FIGURE 9: Schéma de principe d'un spectromètre d'absorption UV- visible double faisceau.

FIGURE 10 : spectrophotomètre UV.

FIGURE 11 : spectre UV de la Rifampicine.

FIGURE 12 : courbe de variation de la stabilité de la RMP dans le Méthanol au cours du temps.

FIGURE 13 : courbe d'effet de la lumière sur la variation de la stabilité de la RMP dans le Méthanol.

FIGURE 14: courbe de variation de la stabilité de la RMP dans le Méthanol à la température de 25°C.

FIGURE 15 : courbe de variation de la stabilité de la RMP dans le Méthanol à la température de 35°C.

FIGURE 16 : courbe de variation de la stabilité de la RMP dans le Méthanol à la température de 45°C.

FIGURE 17 : courbe de variation de la stabilité de la RMP dans l'eau.

FIGURE 18 : courbe de variation de la stabilité de la RMP dans le sérum salé.

FIGURE 19 : courbe de variation de la stabilité de la RMP dans le sérum glucosé.

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I :Doses optimales des médicaments antituberculeux essentiels.

TABLEAU II :les associations médicamenteuses à doses fixes.

TABLEAU III :procédure de la préparation de la gamme d'étalonnage.

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN:** Acide disoxyrubo-nucléaire.
- ARN:** Acide rubo-nucléaire.
- BK:** Bacilles de Kock.
- CHU :** Centre hospitalier universitaire.
- DMP:** Direction du Médicaments et de la Pharmacie.
- EMB:** Ethambutol.
- LCR :** Liquide céphalo-rachidien.
- OMS:** Organisation Mondiale de la santé.
- P.A :** Principe actif.
- PAS:** Para-amino-salicylique.
- PM :** Poids moléculaire.
- PZA:** Pyrazinamide.
- RMP:** Rifampicine.
- SMY:** Stremptomycine.
- SNC:** Système nerveux central.
- TB :** Tuberculose.
- TP :** Température.
- USP:** Pharmacopée aux états unis d'Amérique.
- UV :** Ultra Violet.

INTRODUCTION GENERALE

Les médicaments sont un bien de consommation courante qui doit répondre à l'usage prévu auquel ils étaient prescrits. En effet, une spécialité pharmaceutique doit garantir la guérison des patients et non pas contribuer à nuire à la santé due à un manque de contrôle de la qualité du produit fabriqué aboutissant par la suite à des produits inefficaces voire toxiques.

Si les médicaments sont des produits de consommation, ils comportent à l'instar d'autres produits un aspect éthique, car on peut être obligé de l'acheter quand il peut nous sauver la vie. Les groupes pharmaceutiques ne distribuent pas seulement des médicaments, ils distribuent la possibilité de se soigner et souvent de vivre. Pouvoir bénéficier de soins est un droit fondamental pour tout être humain, droit que certains ont peut être parfois tendance à oublier en privilégiant les intérêts économiques au préjudice de la santé.

A cet effet, tout médicament mis sur le marché doit répondre à trois critères à savoir la qualité, la sécurité et l'efficacité. Ainsi que les exigences légales aux normes officielles en ce qui concerne l'identité, la teneur, la qualité, la pureté des ingrédients et le temps de désagrégation et de dissolution doivent être démontrées par des tests préalables et appropriés.

❖ Présentation du lieu de stage :

➤ Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales est situé au bâtiment J du Centre Hospitalier Universitaire Hassan II de Fès, conçu comme un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales :

- Anatomie pathologique.
- Bactériologie-Immunoanalyses.
- Parasitologie.
- Biochimie et pharmacotoxicologie.
- Hématologie.

- Génétique médicale et biologie moléculaire.
- La création d'un laboratoire central d'analyses médicales au sein du CHU est une première nationale. Cette conception adoptée récemment dans les laboratoires hospitaliers internationaux permet de :
- Optimiser les moyens techniques et le budget de fonctionnement du laboratoire;
 - Offrir des plateaux techniques spécialisés de grande qualité ouverts à toutes les disciplines biologiques;
 - Assurer une formation complète et de haut niveau aux résidents de biologie, de génétique et d'anatomie pathologique. Avec son plateau technique performant, son équipe multidisciplinaire et motivée et sa situation privilégiée au sein d'un CHU qui est dotée d'une offre de soins de grande qualité et fortement diversifiée, le laboratoire peut jouer un rôle majeur au niveau de la région et même au niveau national.

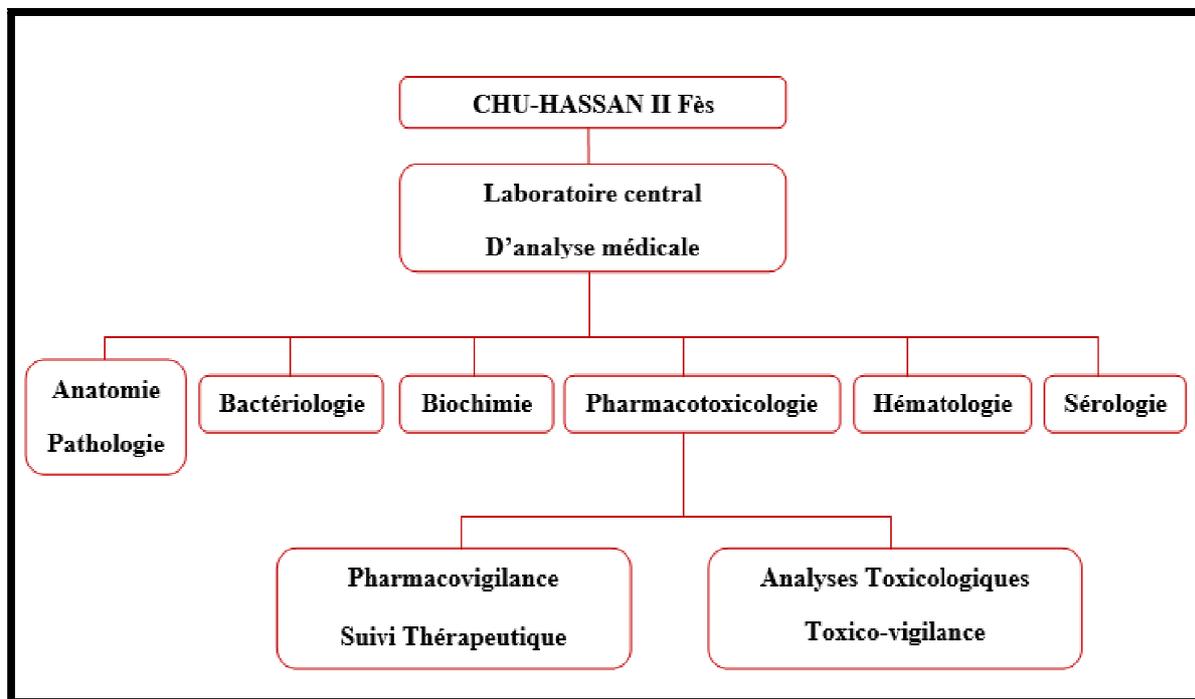


Figure 1 : organigramme de l'unité de pharmacotoxicologie de CHU-Fès.

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LA STABILITE DES MEDICAMENTS

I. ETUDE DE STABILITE D'UN MEDICAMENT :

Un médicament est avant tout une forme galénique, entité où la substance active est associée à un ou plusieurs excipients d'une façon bien déterminée. Ce système artificiel forcé présente un déséquilibre thermodynamique et un potentiel d'interaction de composants en présence responsable d'un certain degré d'incompatibilité, d'instabilité et d'une sensibilité aux facteurs de son environnement.

Pour toutes ces raisons, l'obligation fait que les études de la stabilité et de l'incompatibilité du médicament doivent toujours précéder sa commercialisation et son administration.

L'industriel est donc tenu d'un point de vue moral comme d'un point de vue légal, de fournir des préparations qui conservent leur efficacités thérapeutiques, leur innocuités ainsi que leur aspect initial pendant tout le temps de stockage, commercialisation et utilisation.

L'étude de la stabilité physico chimique des médicaments revêt ainsi des aspects réglementaires et scientifiques étroitement liés, elle repose sur l'acquisition tout entière sous l'action des facteurs physiques, chimiques et biologiques extérieurs suite à des essais dans des conditions accélérées et en temps réel.

1. LES CRITERES DE QUALITE D'UN MEDICAMENT :[1]. [2]. [3]. [4]. [5]. [6]

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

➔ **L'identité:**

Le principe actif doit être présent dans le produit.

➔ **La pureté :**

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

➔ **L'innocuité :**

Le médicament pris dans les conditions normales est inoffensif.

➔ **L'activité :**

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

➔ **L'acceptabilité :**

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

➔ **L'uniformité :**

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

➔ **La biodisponibilité :**

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

➔ **La conservation ou conditionnement :**

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

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

➔ **La stabilité : [7]**

La notion de stabilité des médicaments réside dans la connaissance et l'application de la constante de qualité, sécurité et activité au cours de la conservation et de l'utilisation.

La pharmacopée aux Etats Unies d'Amérique (USP) définit la stabilité d'un produit comme étant son aptitude à conserver, dans les limites fixées et durant toute la période de stockage et d'utilisation, les propriétés et les caractéristiques qu'il possédait au moment de sa fabrication.

C'est un attribut de l'éthique pharmaceutique de garantir l'efficacité et la sécurité d'utilisation d'une forme pharmaceutique pendant toute une période de conservation dont le terme est la date de péremption, une fois précisés le conditionnement adéquat et les conditions de stockage.

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

2. LES TYPES DE STABILITE MEDICAMENTAUSE :

2.1.La stabilité chimique :

Elle est caractérisée par le fait que chacune des matières premières actives conserve, dans des limites fixées, son intégrité chimique et son activité.

2.2. La stabilité physique:

Elle est attestée par le maintien des propriétés physiques initiales, y compris l'aspect, la saveur, l'uniformité ainsi que les caractères de dissolution ou de mise en suspension.

2.3.La stabilité microbiologique :

Elle réside dans le maintien de la stérilité ou de la résistance au développement microbien dans les limites fixées ainsi que l'efficacité des conservateurs éventuellement présents (phénol ; alcool, benzalkonium).

2.4.La stabilité thérapeutique :

Elle exclut tout changement dans l'efficacité thérapeutique.

3. LES FACTEURS INFLUENCANT SUR LA STABILITE DES MEDICAMENTS :[8]

Divers facteurs physico chimiques et biologiques, aussi bien extrinsèques qu'intrinsèques interviennent dans la stabilité des produits pharmaceutiques, ils doivent être connus et pris en

considération lors de la formulation, au cours de la fabrication et pendant le stockage et l'utilisation.

Les études de stabilité doivent confirmer que les précautions prises lors de la formulation, ont permis d'obtenir une forme stable, non influencée par ces facteurs le long de la période de conservation et d'utilisation. Selon **OMS**, les facteurs susceptibles d'avoir une influence sur la stabilité sont :

3.1 Les facteurs intrinsèques :

Il s'agit de facteurs liés aux caractéristiques physiques et chimiques du principe actif et des excipients, à une forme pharmaceutique et sa composition, au procédure de fabrication et à la nature du récipient ou tout autre matériau de conditionnement avec lequel le produit peut être en contact direct ou qui peut être d'une autre façon influencer sa stabilité.

a. Principe actif :[9]

La stabilité du produit fini dépend largement de la stabilité du principe actif qu'il contient, car s'il n'est pas stable il peut se produire une perte d'activité thérapeutique, une apparition du produit de dégradation toxique, et/ou des modifications de biodisponibilité.

b. Excipients :

Les excipients ont une influence non négligeable sur la stabilité du principe actif et sur les propriétés physiques du produit fini.

Pour cela, la stabilité du principe actif est testée dans différents excipients, en comparant les résultats obtenus sur différents mélanges binaires principe actif –excipient avec ceux du principe actif seul, dans les mêmes conditions.[10]

c. Méthode de fabrication :

Le galéniste doit prendre en compte l'action simultanée de l'air; de l'humidité, de l'énergie lumineuse, de la température (chaude / froide), et des microorganismes. Il doit envisager en plus l'action de certains facteurs surajoutés tels que l'intervention humaine lors des opérations de fabrication, conditionnement, ou utilisation du produit.[11]

d. Efficacité de la conservation antimicrobienne :

Dans le cas où les préparations pharmaceutiques elles-mêmes ne possèdent pas de propriétés antimicrobiennes adéquates, des agents de conservation antimicrobienne peuvent être ajoutés, spécialement aux préparations aqueuses pour éviter la prolifération ou de limiter la contamination microbienne.[12]

3.2 Facteur extrinsèque :

Il s'agit des facteurs naturelles d'environnement tels que la température, l'humidité, la lumière, l'oxygène ou encore la contamination microbienne. La réactivité des constituants d'un médicament est sous l'influence de plusieurs facteurs externes.[13]

a. Température froide :

Le froid peut provoquer une recristallisation, une prise en masse et solidification, un démêlage et la casse des conditionnements en verre soit par choc thermique soit par extension de la phase aqueuse lors de la prise en glace.

Donc, le respect de la chaîne du froid des médicaments est un problème complexe qui doit tenir compte d'un grand nombre de contraintes afin d'assurer la stabilité des produits, plus particulièrement lors de la distribution. Le distributeur a la responsabilité de maintenir la qualité des produits du fournisseur jusqu'au client c'est donc par la maîtrise du transport et par une information claire du client que la chaîne du froid ne sera pas rompue.

b. Température chaude :

La chaleur provoque une augmentation de la vitesse des réactions de dégradations, une vaporisation de la phase liquide pouvant entraîner une perte en constituants ou si ces vapeurs ne sont pas captées, modification dans un conditionnement étanche de l'humidité relative, une déshydratation des gélules ou des capsules, une concentration des liquides, une amélioration de croissance des microorganismes thermophile, et parfois une inflammation et explosion.

c. Influence de l'humidité :

Elle est impliquée directement dans les réactions d'hydrolyse, elle peut favoriser les réactions:

- oxydation
- réactions covalentes PA/excipients
- création de l'état amorphe qui permet aux molécules de bouger facilement et donc l'amorçement de réactions chimiques.

L'humidité provoque des réactions d'hydrolyse, elle provoque aussi la dégradation de produits (lyophilisats, effervescents....) le délavage des dragées, le montage des poudres et favorise l'apparition ou la croissance de formes végétatives.[11]. [14]

d. Influence de l'air :

L'air en particulier l'oxygène, favorise toutes réactions de dégradation par l'oxydation et le développement de processus aérobies, il provoque aussi le rancissement des corps gras et l'apparition ou l'évolution des colorations. [11]

e. Influence de la lumière:[11]. [14]

C'est un changement de l'état physique de la solution injectable au cours du temps qui se manifeste par :

- Modification de la cristallinité ;
- Instabilité des émulsions ;
- Précipitation dans les formes liquides etc. ;
- Interaction contenu/contenant ;
- Impact sur la formulation.

II. CAS DE LA RIFAMPICINE :

1. STRUCTURE DE LA MOLECULE :

La rifampicine ou le 5,6,9,17,19,21-hexahydroxy-23-méthoxy-2,4,12,16,18,20,22- heptaméthyl -8-[N- (4- méthyl-1- pipérazinyl) formimidoyl]-2,7-(époxy pentadéca [1,11,13]trienimino)-naphto[2,1-b]furan-1,11(2H)-dione-21- acétoxy possède la structure suivante :[15]

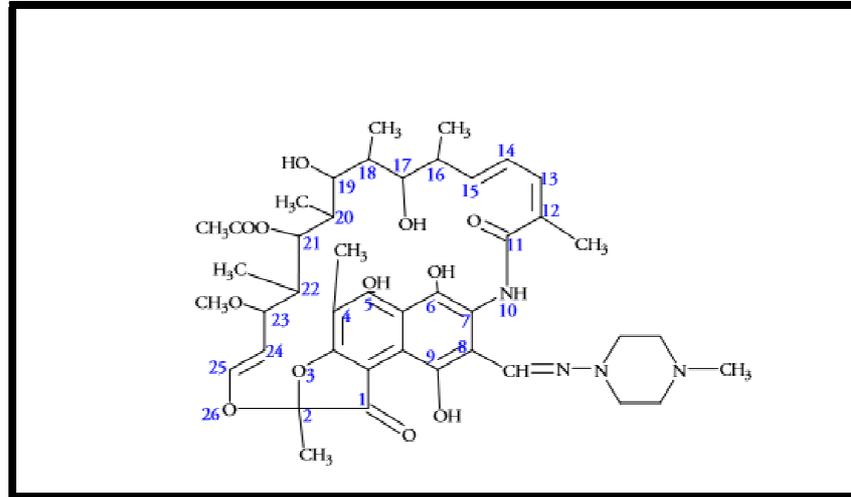


Figure 2 : Rifampicine (C₄₃H₅₈N₄O₁₂)

2. DESCRIPTION DE LA MOLECULE :

Rifampicine (Rifaldazine, Rifadine, Rimactan, Rifoldine, Sinerdol) constitue l'un des médicaments les plus actifs connus ayant une action antituberculeuse et anti staphylocoque. La rifampicine est un antibiotique de semisynthèse avec une structure macrolide. Elle a un aspect colorée rouge – orange brun sous la forme d'une poudre cristalline.

La rifampicine est un antibiotique de la famille des rifamycines SVbactéricide sur tous les bacilles (caverne, caséum et macrophages. Elle est utilisée par voie orale ou injectable notamment dans la tuberculose, la prophylaxie des méningites à méningocoques et la lèpre. La rifampicine est un inducteur enzymatique hépatique puissant et peut entraîner notamment une diminution d'efficacité de la contraception orale. [16]. [17]. [18].

3. ORIGINE ET SHYNTSE DE LA RIFAMPICINE :

en 1959, les rifamycines ont été isolés à partir d'*Amycolatopsis mediterranei*, du sol de *Nocardia mediterranei*, et sont un groupe d'antibiotiques de la famille ansamycine avec une activité antibactérienne prononcé. Plusieurs rifamycines chimiquement modifiés, tels que la rifampicine, ont été utilisés depuis le milieu des années 1960 pour le traitement de la tuberculose et d'autres infections mycobactérienne. Cependant, comme dans le cas de nombreux antibiotiques, leur efficacité est menacée par l'émergence de pathogènes résistants, ce qui rend le développement des rifamycines modifiés ne sont pas soumis à ces mécanismes de résistance sur

une matière d'urgence.

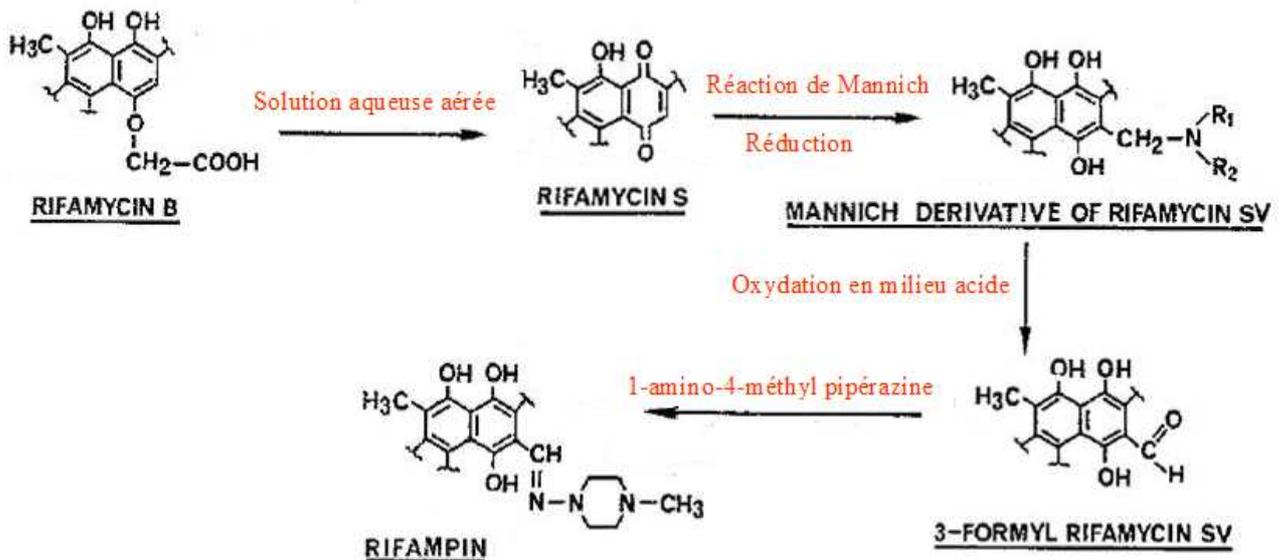
Bien que de nombreux dérivés de la rifamycine aient été synthétisés à partir des produits naturels, les modifications structurales ont été confinées en grande partie à une région de la molécule, de la position C-3 du chromophore naphtoquinone. Plus profondément ancrée altérations structurales du moléculaire difficile accomplir chimiquement et clairement appel à des méthodes alternatives (biosynthèse) de modification de la structure.[19]

La rifamycine B a été transformée en solution aqueuse aérée en une molécule plus active, la rifamycine S, elle-même transformée par réduction en rifamycine SV. Cette dernière est un antibiotique très actif et plus soluble, mais non absorbable par voie orale. En 1965 était synthétisé un dérivé 3-4-méthyl-pipérazinyl-iminométhyle administrable par voie orale, appelé rifampicine, qui est devenu le principal composant de la famille. [20]

Pour obtenir la rifampicine on commence avec la condensation de la 3- formyl- rifampicine SV avec le 1- amino –4 –méthyl – pipérazine en milieu de tétrahydrofuranne.

➤ **Mécanisme de la synthèse :**

STREPTOMYCES MEDITERRANEI



4. LES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES: [21]. [22]. [23]

- **masse moléculaire** : 822,9402 g /mole
- **point de fusion** : 183-188°C
- **pouvoir rotatoire** : $[\alpha]_D^{25} = +10.6^\circ$ (c=0,5% in CDCl₃)
- **La solubilité** : sa solubilité dans l'eau à pH=7,3 est réduite (2,5mg/ml ; 25°C), pourtant la solubilité dans les solvants comme le chloroforme (349mg/ml ; 25°C), le méthanol (16mg/ml ; 25°C).

Diméthylformamide (100mg/ml), ethylacetate (108mg/ml ; 25°C) et dans l'acétone (14mg/ml ; 25°C)

Aussi la rifampicine est soluble à 37°C dans l'HCl, (200mg/ml) et dans le tampon phosphate pH 7,4 (9,9 mg/ml)

- **Conditions de conservation**: La conservation se fait à 25°C dans des récipients hermétiques à l'abri de la lumière, de la chaleur et de l'humidité.

5. PHARMACOLOGIE :

a. **Spectre d'action** :

La rifampicine fait partie des antibiotiques du groupe des rifomycines ayant une activité sur les organismes extracellulaires à croissance rapide, mais présente également une activité bactéricide intracellulaire ainsi qu'une activité bactéricide sur le *mycobacteriumtuberculosis* à croissance lente et intermittente. Elle est également active sur le *M. aviumComplex*, le *M. Kansasii*, et le *M. leprae*.

b. **Mécanisme d'action** :

La rifampicine inhibe l'activité de l'ARN polymérase, dépendant de l'ADN au niveau des cellules sensibles. Elle interagit spécifiquement avec l'ARN polymérase des bactéries, mais n'inhibe pas cette enzyme chez les mammifères. [24]

La rifampicine agit en inhibant l'ARN-polymérase des bactéries, empêchant ainsi la transcription de l'ADN bactérien. Se fixant directement à cette enzyme, elle est efficace déjà à de faibles concentrations et, contrairement à la majorité des antibiotiques, elle n'interfère pas avec l'ARN-polymérase des mammifères. [25]

Parmi ses propriétés remarquables, on relève sa très forte pénétration tissulaire, pouvant littéralement diffuser dans la quasi-totalité des tissus du corps humain, son caractère lipophile lui permet ainsi de traverser sans difficulté les membranes cellulaires. Elle conserve également son activité antibactérienne dans des environnements à pH acide. [26]

c. Pharmacocinétique :

Résorption : Bonne par voie orale. Pic sanguin en 2 à 4 heures, si elle est absorbée à jeun et à distance des repas, sinon la résorption est retardée. Diffusion : Sa fixation aux protéines plasmatiques est de 75%. La diffusion est excellente, sauf dans les organes riches en lipides (SNC) et dans les épanchements, mais elle est bonne dans le poumon, suffisante dans le LCR, le caséum et les cavernes.

Transformation : La rifampicine est un puissant inducteur enzymatique du système microsomal oxydatif hépatique, elle induit son propre métabolisme. Sa demi-vie passe de 6 heures le premier jour d'administration à 3-4 heures au septième jour. Elle peut augmenter le catabolisme hépatique de certains médicaments associés et compromettre leur efficacité (quelques cas de grossesse survenant malgré une contraception oestroprogestative bien suivie lors de l'administration de rifampicine).

Élimination : La rifampicine subit une élimination biliaire et un cycle entérohépatique, elle est contre-indiquée en cas d'obstruction complète des voies biliaires. Elle est donc éliminée par les fèces, l'urine (20%), la salive, les larmes, tous colorés en rouge orangé.

6. STABILITE DE LA RIFAMPICINE :

Rifampicine devrait être stable pendant au moins deux ans s'il est entreposé desséchée à -20°C et à l'abri de la lumière.[27].

La stabilité de la solution de la rifampicine: DMSO (10 mg / ml à environ 8 mois à 15 ° C), eau-éthanol (8:2), 1 mg / ml, 8 semaines à 4 ° C dans des solutions aqueuses faiblement basiques (pH 8, 2, 20 à 22 ° C)[28].

En présence d'air, la rifampicine est convertie en quinone rifampicine. L'addition d'ascorbate de sodium permet d'éviter son oxydation. Dans des conditions basiques rifampicine subit une désacétylation à 22 ° C formant le 25-desacetyl-rifampin (plus d'activité antibactérienne est maintenue). La Rifampicine se décompose rapidement dans des conditions acides ou alcalines à

25 ° C mais lentement dans des conditions neutres. C'est à dire à 200 ug / ml, à pH 2,3 rifampicine est hydrolysé à 3 formylrifampicin. Il est préférable de préparer des solutions aqueuses avec un solvant exempt d'oxygène et à un pH neutre.

CHAPITRE II : GENERALITES SUR LA TUBERCULOSE ET LES ANTITUBERCULEUX

I. LA TUBERCULOSE :

1. Généralités :

Près d'un tiers de la population mondiale, soit deux milliards d'individus, est infecté par *Mycobacterium tuberculosis* et court le risque de contracter la maladie. Plus de huit millions de personnes développent une tuberculose évolutive (TB) chaque année, et environ deux millions en meurent. La tuberculose est une maladie infectieuse, dangereuse, transmissible par voie aérienne et contagieuse, causée par des bacilles du complexe *Mycobacterium tuberculosis* qui comprend *Mycobacterium tuberculosis* stricto sensu (bacille de Koch décrit en 1882 par Robert Koch), *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* et *M. pinnipedii*. [29]

2. Principe de traitement de la tuberculose :

Les conditions d'une chimiothérapie correcte sont :

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

Le traitement sera prescrit à chaque patient dont la tuberculose a été confirmée et doit être **donné gratuitement** aux malades. [30]

3. Les Différentes étapes du traitement de la tuberculose:

- ✓ Le traitement des cas à frottis positifs doit toujours comprendre deux phases :
- ✓ la phase initiale « intensive » durant laquelle 3 à 4 (voire parfois 5) antibiotiques antituberculeux sont prescrits. Elle dure au moins deux mois, et se poursuivra jusqu'à ce que les examens de crachats soient négatifs.

Cette phase est la phase capitale de la chimiothérapie ;

- ✓ la phase de continuation durant laquelle le patient prend le plus souvent 2 médicaments antituberculeux. Sa durée doit être insuffisamment longue pour permettre l'élimination

de tous les bacilles.

II. LES ANTITUBERCULEUX :

1. Introduction :

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

2. Classification des antituberculeux : [31]

Dans le traitement de la tuberculose, les médicaments peuvent être divisés en deux grandes catégories :

- Médicaments de la première ligne : Isoniazide, streptomycine, rifampicine, ethambutol et pyrazinamide.
- Médicaments de la deuxième ligne : Ethionamide, para-amino-salicylique, ofloxacine, ciprofloxacine, cycloserine, amikacin, kanamycin, viomycin et capreomycin.

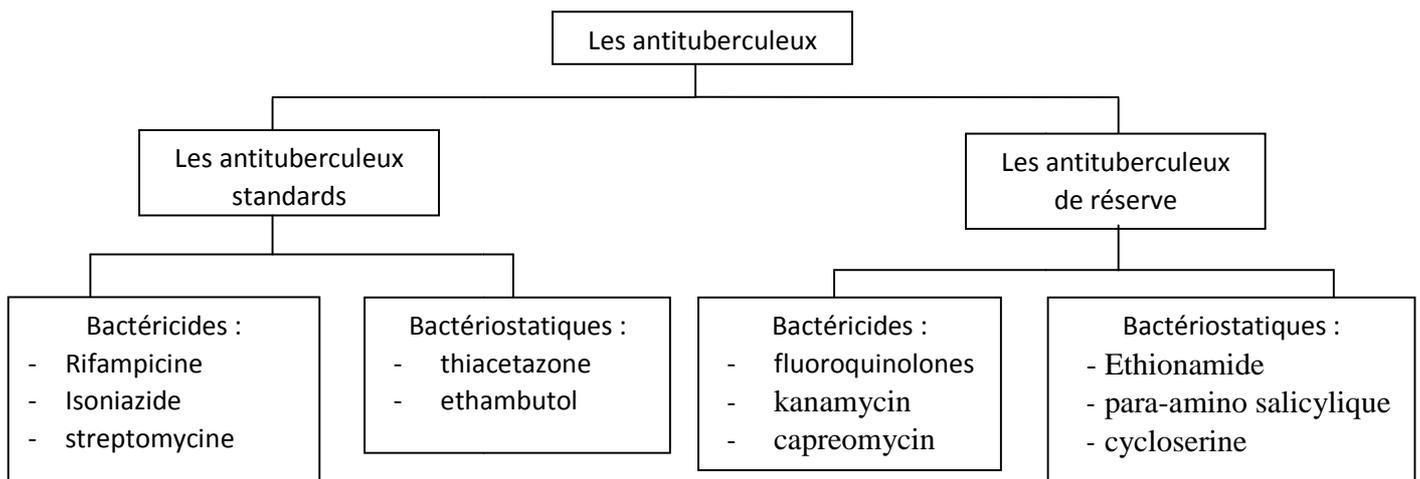


Figure 3 : classification des médicaments antituberculeux.

3. [La posologie des antituberculeux essentiels :](#)

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

Tableau I : Doses optimales des médicaments antituberculeux essentiels (la fourchette est donnée entre parenthèses)[32] :

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

4. [Les actualités existantes :](#)

Tableau II : les associations médicamenteuses à doses fixes : [32]

Médicaments	Présentation	Dosage
Rifampicine –Isoniazide (RH)	CP	300 mg + 150 mg 150 mg + 75 mg
	CP granulés	60 mg, + 30 mg
Rifampicine –Isoniazide Pyrazinamide (RHZ)	cp	150 +75+400
Rifampicine –Isoniazide Pyrazinamide – Ethambutol (RHZE)	Cp	150 +75+400+275

5. Les autres antituberculeux majeurs :

a. L'isoniazide (INH) :

+ Structure :

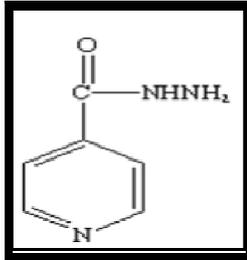


Figure 4 : Isoniazide (C₆H₇N₃O) [21] PM = 137,14

+ Caractères physico-chimiques :

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

b. L'éthambutol(EMB) :

+ Structure :

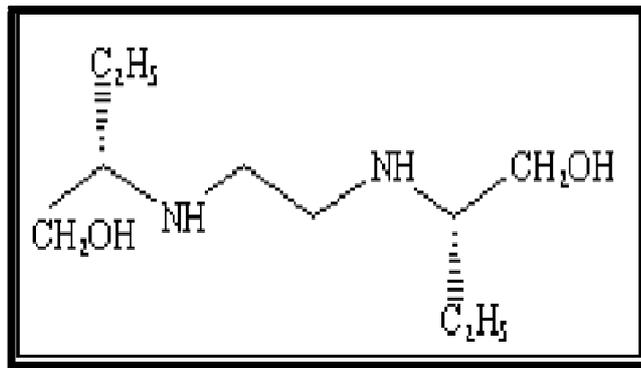


Figure 5: Ethambutol (C₁₀H₂₄N₂O₂) [21] PM = 277,2

+ Caractères physico-chimiques :

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

c. Le pyrazinamide (PZA)

✚ Structure : [33]

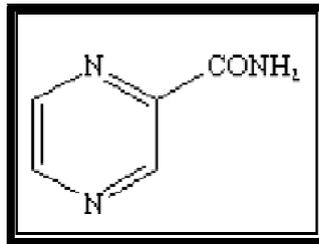


Figure 6 : Pyrazinamide (C₅H₅N₃O) [21] PM = 123,11

✚ Caractères physico-chimiques :

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

d. La streptomycine (SMY) :

✚ Structure :

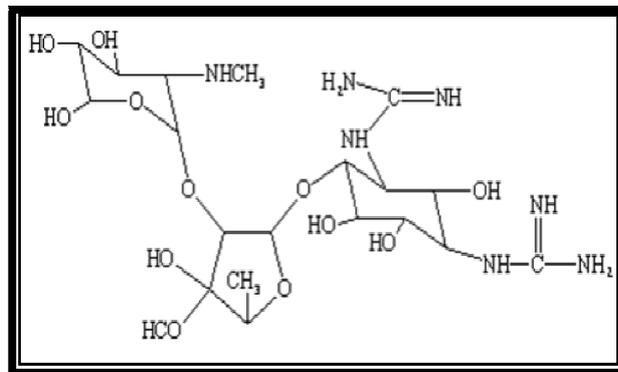


Figure 7 : Streptomycine (C₁₉H₃₇N₇O₁₂) [21] PM = 555,41

✚ Caractères physico-chimiques :

La streptomycine est une poudre grisâtre, inodore et au goût légèrement amer. Les formes sels sont hygroscopiques mais ne sont pas affectées par exposition à l'air et à la lumière.

La streptomycine a une grande activité en pH alcalin. Elle est soluble dans l'eau, et pratiquement insoluble dans les solvants organiques.

6. Les antituberculeux de seconde intention :

a. La Ciprofloxacine :

✚ Structure :[34]

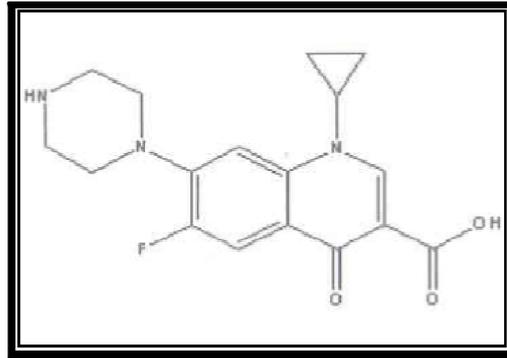


Figure 8 : Ciprofloxacine (C₁₇H₁₈FN₃O₃) [21] PM = 331,3

✚ Caractères physico-chimiques :

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

DEUXIEME PARTIE

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES UTILISES POUR

L'EDUTE DE LA STABILITE DE LA RIFAMPICINE

I. INTRODUCTION :

L'objectif de l'essai de stabilité est de fournir des informations sur la façon dont la qualité d'un médicament varie avec une période de temps sous l'influence de plusieurs facteurs environnementaux, tels que la pression, la température, la lumière et l'humidité, donc permettant une recommandation raisonnable à faire.

Dans le domaine pharmaceutique, l'expression " stabilité " se compose de plusieurs concepts qui comprennent à la fois les propriétés physiques et chimiques d'un médicament. Cependant, les études de stabilité ne visent que la stabilité chimique des ingrédients actifs de médicaments, dans ce cas c'est la rifampicine.

L'intention derrière les études normales est de montrer que la substance médicamenteuse sera conforme aux spécifications pendant une certaine période de temps recommandée, appelé comme la période de contre-essai, tandis que dans les conditions recommandées de stockage.

Les études accélérées sont définies comme les études entreprises pour démontrer les caractéristiques de stabilité de la substance médicamenteuse sous l'influence de divers facteurs extrinsèques.

Ces études sont effectuées sur les échantillons du même lot dans diverses conditions qui comprennent des incréments de température comme un facteur d'accélération.

Des Études accéléré sont conduites à fournir un ensemble de données qui permettent la caractérisation de la stabilité intrinsèque de la substance médicamenteuse, l'établissement des voies de dégradation, en évaluant la cinétique de taux et l'identification des produits de

décomposition de base appelées aussi les produits de dégradation.

Dans certains cas, la RMP est utilisée dans les services de la réanimation médicale après reconstitution de la poudre de la gélule. En suspension dans l'eau de robinet, pour une éventuelle administration par gavage pour les malades comateux.

Dans cette optique, nous avons réalisé cette étude sur l'évaluation de la durée de solubilité de la RMP dans l'eau, en respectant les mêmes conditions de préparation de la solution que celles réalisées aux services de la réanimation médicale et aussi dans le sérum salé 0,9% et le glucose 5%.

II. MATERIELS :

1. APPAREILLAGE :

- ⊕ Agitateur magnétique.
- ⊕ pH-mètre.
- ⊕ Etuve.
- ⊕ Balance de précision.

2. VERRERIE :

- ⊕ Becher
- ⊕ Erlenmeyer
- ⊕ Eprouvettes 50ml, 25ml, 10ml
- ⊕ Pipettes 1ml, 20ml, 5ml
- ⊕ Micropipettes 100ul, 1000ul.

3. REACTIFS :

- ⊕ Antituberculeux utilisé : la rifampicine

	DCI	Forme	Dose
Rifamycine	Rifampicine	Gélule	300 mg

- ⊕ Solvants :
- ⊕ Méthanol
- ⊕ Eau distillée
- ⊕ Sérum salé
- ⊕ Sérum glycosé

⊕ Solution tampon phosphate $\text{pH}=7,4$

➤ *PRÉPARATION DU TAMPON PHOSPHATE 0,1 M AVEC UN PH=7,4 :*

⊕ Phosphate monosodique : $m(\text{NaHPO}_4) = 3,1\text{g}$

⊕ Phosphate disodique : $m(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 10,9\text{g}$

Pour préparer ce tampon, nous avons dissous les différentes quantités pesées dans 1000ml d'eau distillée avec agitation. Le pH est ajusté jusqu'à 7,4. Cette solution peut être stockée pour 1 mois à 4°C.

III. METHODES D'IDENTIFICATION DE LA RIFAMPICINE :

1. LA SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION DANS L'UV VISIBLE : [34]

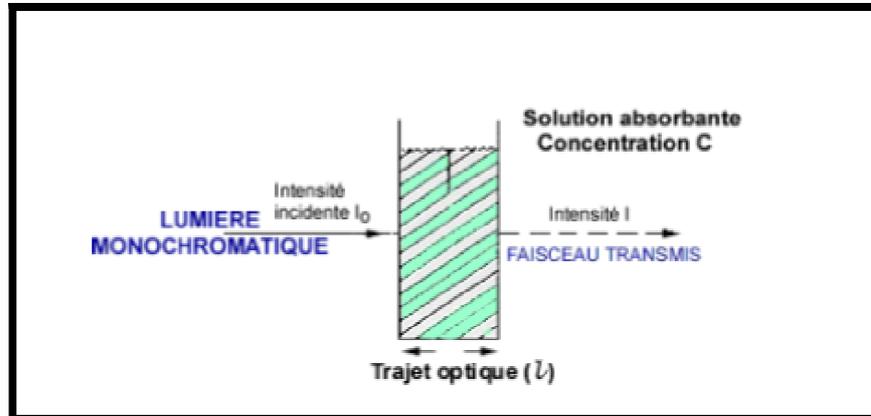
✚ Principe :

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu les énergies les plus importantes de la chimie (environ de 13000 à 50000 cm^{-1} soit 160 à 665 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). L'ordre de grandeur des énergies mises en jeu est celui des énergies de liaison des molécules et ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons.

Plus généralement, ils provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules. Certaines molécules organiques ont la propriété d'absorber les radiations de courte longueur d'onde (200-800 nm) et peuvent être caractérisées grâce à cette propriété. Le domaine du visible et de l'UV a été abondamment étudié et ce depuis longtemps. Mais s'il est indispensable pour une approche expérimentale de la nature de la liaison, il est pauvre en information structurale. Son emploi est de plus en plus réservé à l'analyse quantitative via la loi de Beer-Lambert.

✚ Loi d'absorption de la lumière (Beer-Lambert) :

Soit une lumière monochromatique traversant une solution absorbante de concentration C contenue dans une cuve d'épaisseur l .



Une partie de ce rayonnement sera absorbée par l'échantillon et une partie sera transmise. Bouguer, Lambert et Beer ont étudié les relations qui existent entre **I₀** et **I** : l'intensité d'une lumière monochromatique traversant un milieu où elle est absorbée décroît de façon exponentielle :

$$I = I_0 e^{-kIC}$$

- ◆ **I₀** : l'intensité de la lumière incidente.
- ◆ **I** : l'intensité après passage à travers la cuve contenant la solution (intensité transmise)
- ◆ **l** : la distance traversée par la lumière (épaisseur de la cuve) (en cm)
- ◆ **C** : la concentration des espèces absorbantes.
- ◆ **K** : est une constante caractéristique de l'échantillon.

Cette équation peut se réécrire : $\log(I_0/I) = kIC/2.3 = \epsilon \cdot l \cdot C$.

- ◆ **Log(I₀/I)** : est appelé absorbance (A)
- ◆ **I/I₀ = T** : est la transmission
- ◆ **% T** : est la transmittance.
- ◆ **ε** : est le coefficient d'extinction molaire. c'est une caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée. Si C (la molarité), ε est en L.mol⁻¹.cm⁻¹.

On obtient alors la relation connue sous le nom de loi de Beer-Lambert :

$$A = \text{Log} (I_0/I) = \epsilon l C$$

- ◆ Validité de la loi de Beer-Lambert :

La loi de Beer-Lambert s'applique pour des radiations monochromatiques et sa validité est bonne lorsqu'on travaille avec des solutions suffisamment diluées pour ne pas modifier les propriétés des molécules (association, complexation...).

Les applications de la spectroscopie UV :

La spectrométrie s'utilise principalement dans deux cas:

- ◆ en laboratoire afin d'établir un tracé quantitatif d'un spectre d'absorption ou de réflexion en fonction de la longueur d'onde,
- ◆ en analyse industrielle soit pour déterminer la composition d'un échantillon, soit pour mesurer des paramètres (couleur, turbidité, ...).

appareillage :

L'étude des absorptions nécessite l'utilisation d'un spectromètre UV - Visible. La figure suivante représente le schéma de principe d'un spectromètre d'absorption UV- visible double faisceau.

Il est constitué des éléments suivants :

◆ **Source :**

Le rôle de la source est de fournir la radiation lumineuse. Dans la région de l'UV (190 à 400 nm), la source est une lampe à décharge au deutérium. Une lampe à filament de tungstène est utilisée pour la région allant de 350 à 800 nm.

◆ **Monochromateur :**

Le monochromateur a pour rôle de disperser le rayonnement polychromatique provenant de la source et d'obtenir des radiations monochromatiques. Les monochromateurs les plus utilisés sont composés en général d'une fente d'entrée, d'un dispositif de dispersion comme un

prisme ou un réseau et d'une fente de sortie. L'échantillon et le détecteur, placés juste derrière le monochromateur, ne seront donc traversés que par un domaine étroit de longueurs d'onde.

◆ **Diviseur de faisceau ou photomètre :**

La lumière monochromatique qui émerge du monochromateur est séparée en deux faisceaux qui traversent les compartiments de l'échantillon et de la référence.

◆ **Détecteur :**

Le détecteur est un tube photomultiplicateur qui convertit la lumière reçue en courant.

Ce type de détecteurs est de plus en plus remplacé par des photodiodes (semi-conducteurs) plus sensibles. Le détecteur est relié à un enregistreur qui permet de tracer un spectre d'absorption de l'échantillon analysé.



Figure 9 : spectrophotomètre UV

✚ **Mode opératoire du dosage de la rifampicine par UV :**

Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible.

➤ **PREPARATION DE LA GAMME D'ETALONNAGE :**

Pour déterminer la concentration de notre espèce colorée qui est la rifampicine (couleur de la solution est du jaune orangée), on doit d'abord effectuer une courbe d'étalonnage en utilisant la loi de Beer-Lambert. Pour le traçage de cette droite on a préparé des solutions étalons par dilution à partir d'une solution qui servira et qui est appelée solution mère.

Les valeurs qui ont pris en considération sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau III : procédure de la préparation de la gamme d'étalonnage.

les solutions filles	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
la concentration dans chaque solution (mg/mL)	0,1	0,125	0,16	0,25	0,5
volume de la solution mère (mL)	1	1,25	1,6	2,5	5
volume du Méthanol ajouté (mL)	9	8,75	8,4	7,5	5
volume total dans les solutions filles (mL)	10	10	10	10	10
facteur de dilution ($C_m/C_x = V_m/V_x$)	10	8	6,25	4	2

➤ **SOLUTION À EXAMINER : [PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 7.0]**

Pour étudier la stabilité de la rifampicine nous avons adopté la méthode décrite dans la pharmacopée Européenne.

Disposant d'un échantillon de la rifampicine (gélule de 300mg) et d'un spectrophotomètre permettant d'explorer le domaine du visible, nous avons préparé une solution de la rifampicine selon le protocole suivant :

Dissolvez 50 mg de rifampicine dans 50 mL de méthanol. Prélevez 1 mL de cette solution et complétez à 50 mL avec la solution tampon phosphate pH 7,4 R.

- ◆ *Région spectrale* : 220-500 nm.
- ◆ *Maximums d'absorption* : à 237 nm, 254 nm, 334 nm et 475 nm.
- ◆ *Rapport des absorbances* : A_{334}/A_{475} = environ 1,75
- ◆ *Blanc utilisé* : 1mL du Méthanol + 4 mL du tampon phosphate.

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

I. RESULTATS ET DISCUSSIONS:

1. Spectre UV de la molécule de la rifampicine :

Tableau III : les données du spectre UV-VIS de la RMP :

Données du spectre UV	
max (nm) littérature	max (nm) expérimental
237	236
334	336
475	479

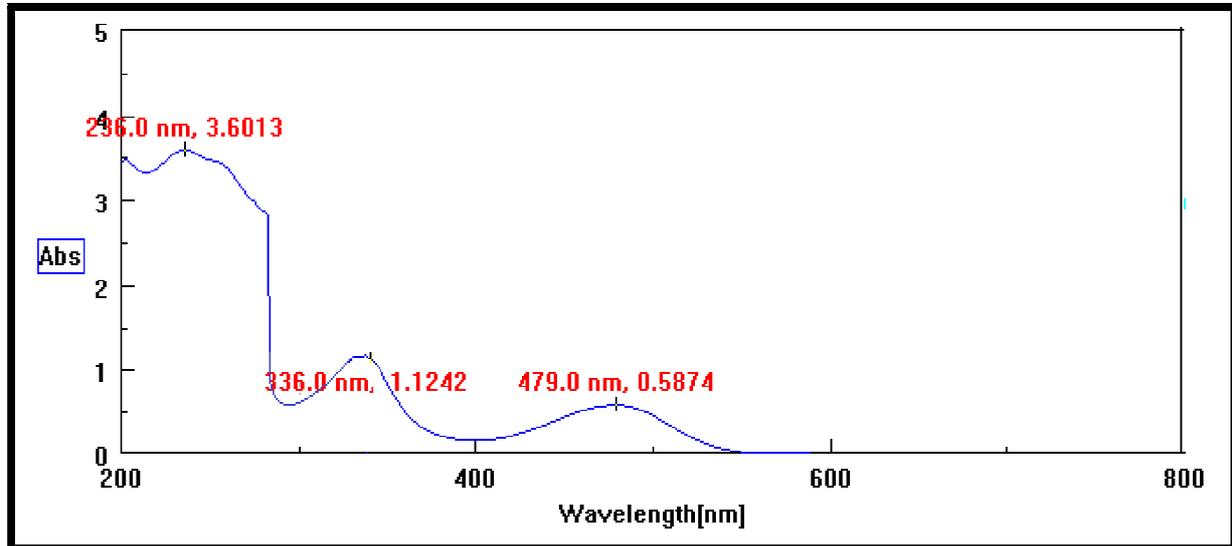


Figure 10 : Spectre UV-VIS de la rifampicine

Interprétation du spectre :

D'après la pharmacopée européenne la rifampicine présente quatre longueur d'onde maximum ($\lambda_{\max 1} = 237 \text{ nm}$; $\lambda_{\max 2} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\max 3} = 336 \text{ nm}$; $\lambda_{\max 4} = 475 \text{ nm}$).

Dans notre spectre, il y a que trois λ_{\max} qui apparaissent, et cela peut être dû au produit avec lequel on a travaillé, ou bien de l'appareil. Comme il peut être aussi de dosage effectué.

2. Etude de stabilité de la RIF au cours du temps et dans l'obscurité :

Durée	concentration	absorbance
t0	0,1	0,1064
2H	0,09	0,0903
4H	0,08	0,0879
6H	0,07	0,0744
8H	0,07	0,0711
24H	0,1	0,1085
48H	0,12	0,1232

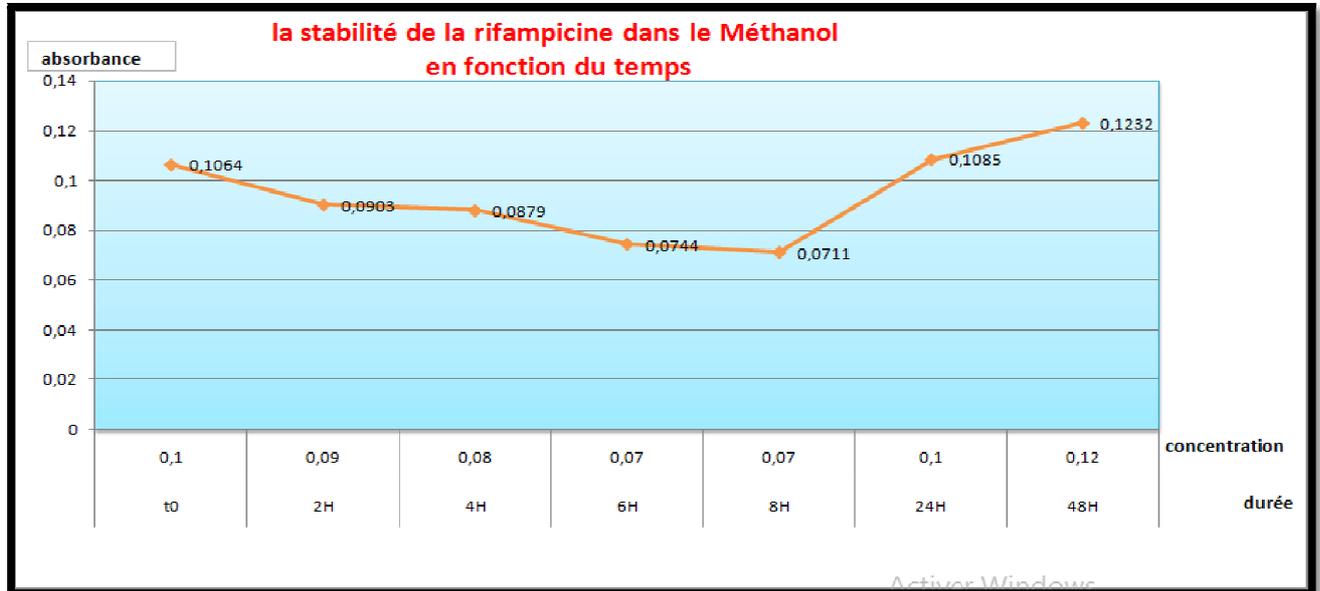


Figure 11 : courbe de variation de la stabilité de la RMP au cours du temps.

Interprétations :

D'après la courbe, on remarque qu'il y a une diminution de l'absorbance de la rifampicine au bout de 8 heures après la préparation de la solution. Cette diminution est expliquée par la dégradation de la molécule de la rifampicine.

Après 24 heures, on a une augmentation de l'absorbance de la solution étudiée ce qui est expliqué par la formation d'un produit secondaire de dégradation et qui présente une absorbance dans la même longueur d'onde que la rifampicine.

Donc la rifampicine est instable dans le Méthanol en fonction de temps.

3. Effet de la lumière sur la stabilité de la rifampicine :

durée	concentration	absorbance
t0	0,1	0,1066
2H	0,09	0,0918
4H	0,07	0,07777
6H	0,08	0,1917
8H	0,06	0,0602
24H	0,08	0,0881
48H	0,08	0,1232

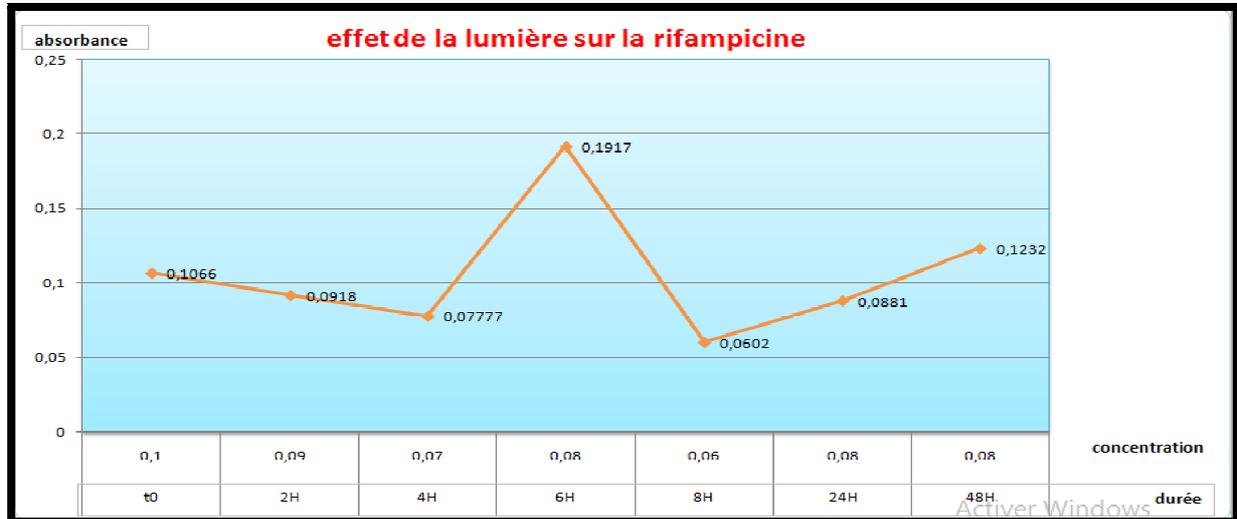


Figure 12 : courbe d'effet de la lumière sur la variation de la stabilité de la RMP.

Interprétations :

La courbe montre une diminution de l'absorbance après 4 heures de la préparation de la solution. Cette diminution est expliquée par la dégradation de la rifampicine, donc sa concentration va diminuer. Après 6 heures (c.à.d. à 14H30) l'absorbance atteint son maximum car la solution de la rifampicine a reçu le max de lumière lors de son exposition au soleil et elle a passé dans un état excité. Après 8 heures l'absorbance a eu une augmentation, c'est un produit de photodégradation qui apparaît.

Donc, la rifampicine est un principe actif non-photostable et sa photodégradation peut conduire à une diminution de sa efficacité thérapeutique et parfois à la formation de produits à l'origine d'effets toxiques. Selon la littérature ces produits de photodégradation sont notamment à l'origine d'une oxydation de la fraction naphthoquinone pour donner la rifampicine quinone et d'une oxydation de l'amine III^{aire} présent sur le fragment pipérazine pour donner le N-oxyde [35]. [36]. [37].

4. Effet de la température sur la stabilité de la rifampicine :

Cette étude est réalisée en soumettant le médicament à des températures élevées pour réaliser un vieillissement accéléré. Pour savoir l'effet de l'augmentation de la température sur la stabilité de la RMP. On a pris une gélule du médicament qui contient ce P.A et on l'a mis dans l'étuve pendant 48 heures en variant la température (25°C, 35°C et 45°C).

❖ A 25°C :

concentration		absorbance
t0	0,14	0,1484
2H	0,13	0,1404
4H	0,12	0,1246
6H	0,12	0,1245
8H	0,12	0,1222
24H	0,18	0,1924
48H	0,15	0,1578

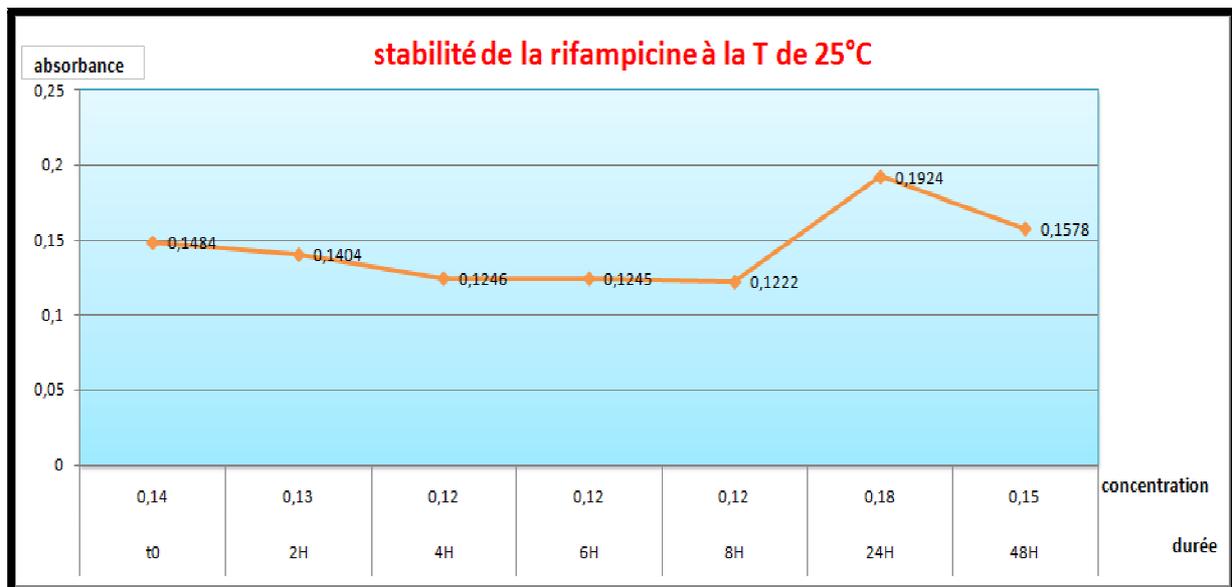


Figure 13: courbe de variation de la stabilité de la RMP à la température de 25°C.

✚ Interprétations :

On remarque dans cette courbe que la RMP a resté presque stable pendant 8 heures en exposition à 25°C. Mais après, l'absorbance a eu une augmentation. Cette dernière est due à la formation d'un produit de dégradation qui s'absorbe dans la même longueur d'onde que la RMP. Cette dégradation est due à l'accumulation de l'effet de la température au cours du temps.

❖ A 35°C :

	concentration	absorbance
t0	0,09	0,0540
2H	0,11	0,0606
4H	0,12	0,0687
6H	0,10	0,0693
8H	0,14	0,0831
24H	0,19	0,1095
48H	0,19	0,1107

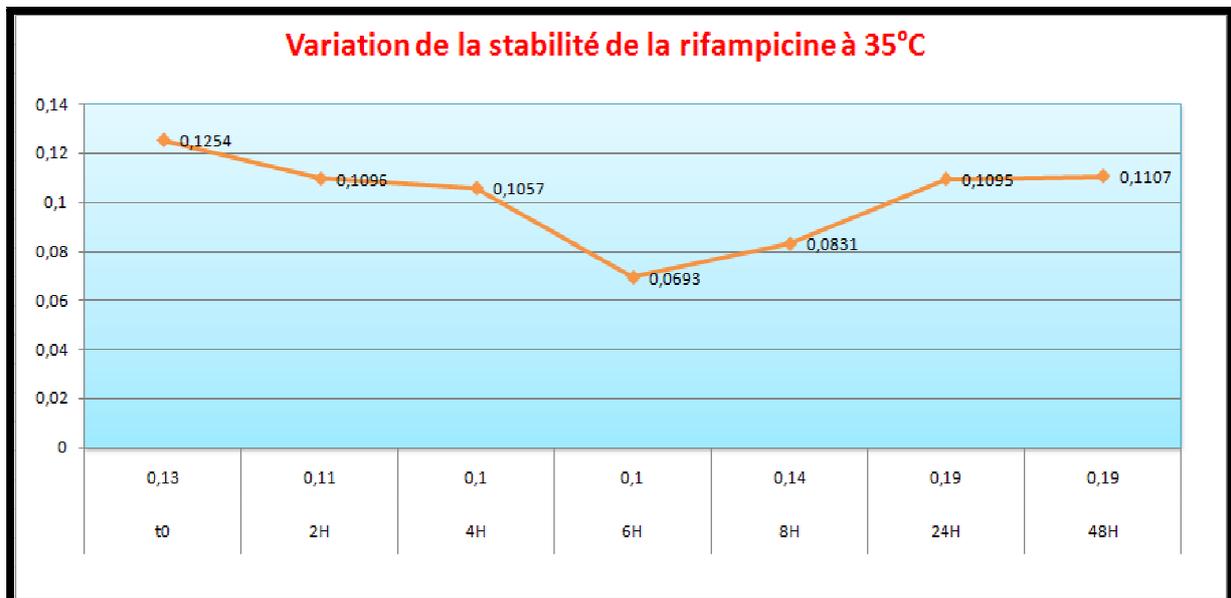


Figure 14: courbe de variation de la stabilité de la RMP à la température de 35°C

Interprétations:

On remarque l'absorbance a diminué progressivement c.à.d. que la concentration a diminué aussi, et c'est expliqué par la dégradation de la RMP sous l'effet de cette TP au cours du temps. (23% de la RMP qui été dégradée).

Après 6 heures, l'absorbance a eu une augmentation qui est du à la formation d'un produit de dégradation qui s'absorbe dans la même région spectrale que la RMP.

❖ A 45°C :

	concentration	absorbance
t0	0,1	0,1067
2H	0,06	0,0653
4H	0,06	0,0631
6H	0,04	0,0428
8H	0,03	0,0314
24H	0,09	0,054
48H	0,12	0,1303

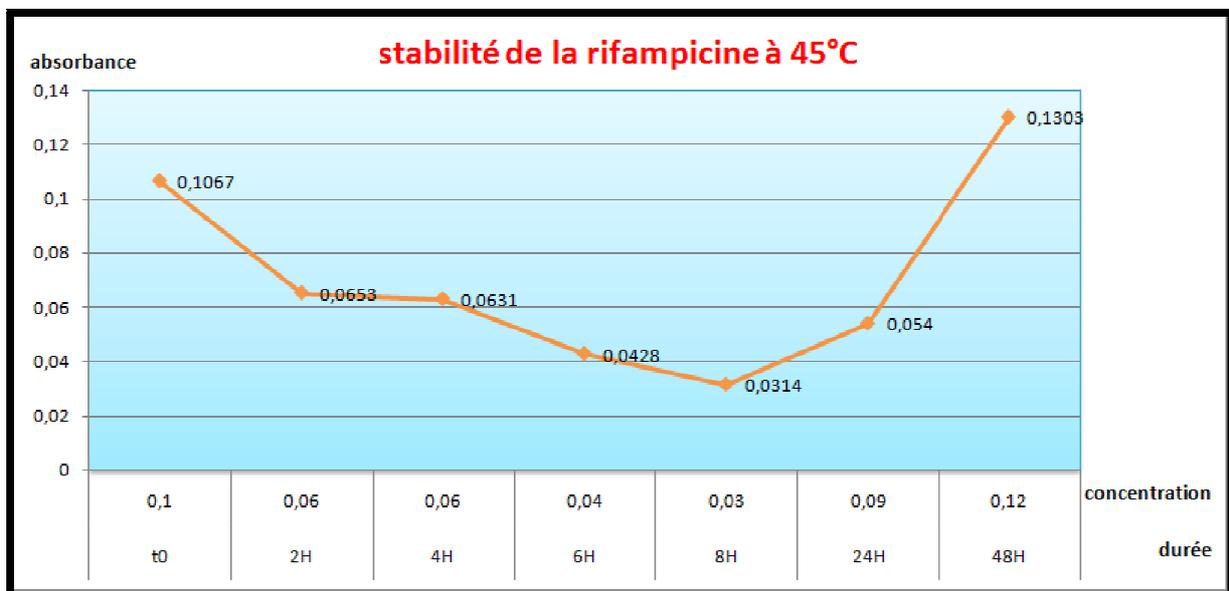


Figure 15: courbe de variation de la stabilité de la RMP à la température de 45°C.

✚ Interprétations :

On remarque l'absorbance a diminué progressivement au cours du temps à cette TP de 45°C. (30% de la RMP qui été dégradée). Après 8 heures l'absorbance a commencé d'augmenter, et cette augmentation est expliquée par l'apparition d'un nouveau produit de dégradation.

➤ **Discussions :**

Les effets délétères de la chaleur sont cumulatifs lorsque le seuil minimal d'activation des réactions de dégradation est atteint. En définitive les effets de la température peuvent causer :

- Une modification des caractères organoleptiques et physico-chimiques
- Une modification de la sensibilité microbiologique.

-Une dégradation du P.A, de l'excipient ou de la forme galénique entraînant une perte d'efficacité, voire une toxicité. Les études de stabilité à basse température incluant un cycle congélation/décongélation ne sont pas toujours réalisées. La durée et les conditions de conservation des médicaments sont fixées en fonction des résultats de ces essais de stabilité. [38]. En règle générale, l'exposition de ce médicament au froid (quelques heures) n'a pas de conséquence sur sa stabilité ou sa qualité, toutefois la congélation doit être évitée, en particulier pour tous les liquides. Les formes solides telles que les comprimés ou les gélules peuvent être détériorées par le gel.

Pour compléter cette étude il est judicieux de faire des tests à différentes températures telque 10,°C, 15°C,20°C, 30°C ,40°C et de refaire celle de 35°C qui présente des résultats non-interprétables.

5. Etude de stabilité de la rifampicine dans des différentes solutions :

- Dans l'eau :

temps	concentration
0H	0,04
2H	0,03
4H	0,03
6H	0,01
8H	0,01
24H	0,11
48H	0,14

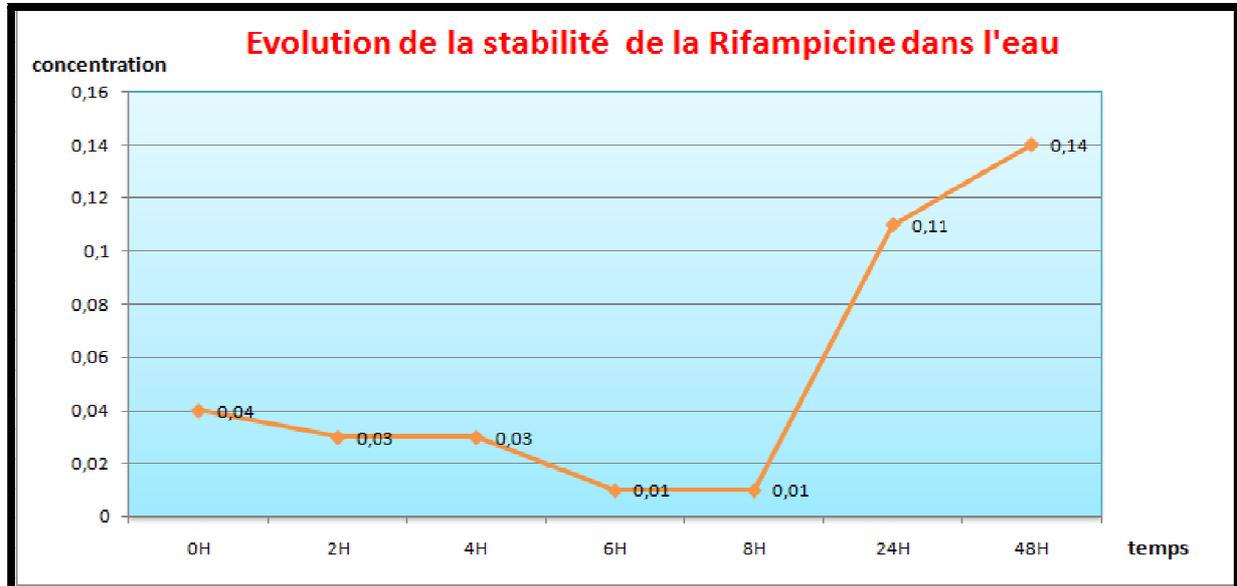


Figure 16 : courbe de variation de la stabilité de la RMP dans l'eau.

Interprétations :

En comparant les résultats de cette courbe et celle de la variation de la stabilité de la rifampicine dans le Méthanol, on peut clairement remarquer que la rifampicine n'est pas si soluble dans l'eau. (Seulement 40% qui est soluble). On remarque aussi une diminution de la concentration après 8 heures de la préparation de la solution de la rifampicine dans l'eau. Cette diminution est expliquée par la dégradation de la molécule dans l'eau au cours du temps. Ensuite on voit une augmentation de la concentration de la solution. C'est un nouveau produit de dégradation qui s'est produit. Donc, on peut dire que la rifampicine est instable dans l'eau.

- Dans le sérum salé :

temps	Concentration
0H	0,05
2H	0,05
4H	0,05
6H	0,05
8H	0,02
24H	0,05
48H	0,07

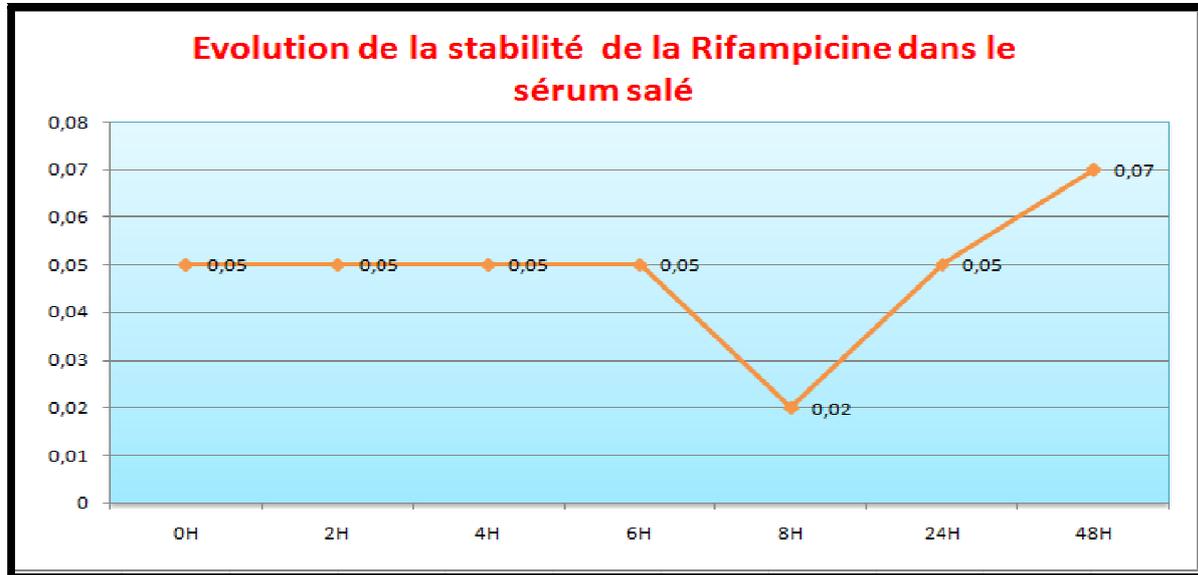


Figure 17 : courbe de variation de la stabilité de la RMP dans le sérum salé.

On remarque que le sérum salé présente la meilleure concentration initiale de la rifampicine (50% de rifampicine qui est soluble).

La RMP a resté stable pendant 6 heures, après il a commencé à se dégrader. après 48 heures la concentration a augmenté, et c'est expliquée par l'apparition d'un produit de dégradation de la RMP.

- Dans le sérum glucosé de 5% :

temps	concentration
0H	0,01
2H	0,01
4H	0,03
6H	0,04
8H	0,07
24H	0,02
48H	0,04

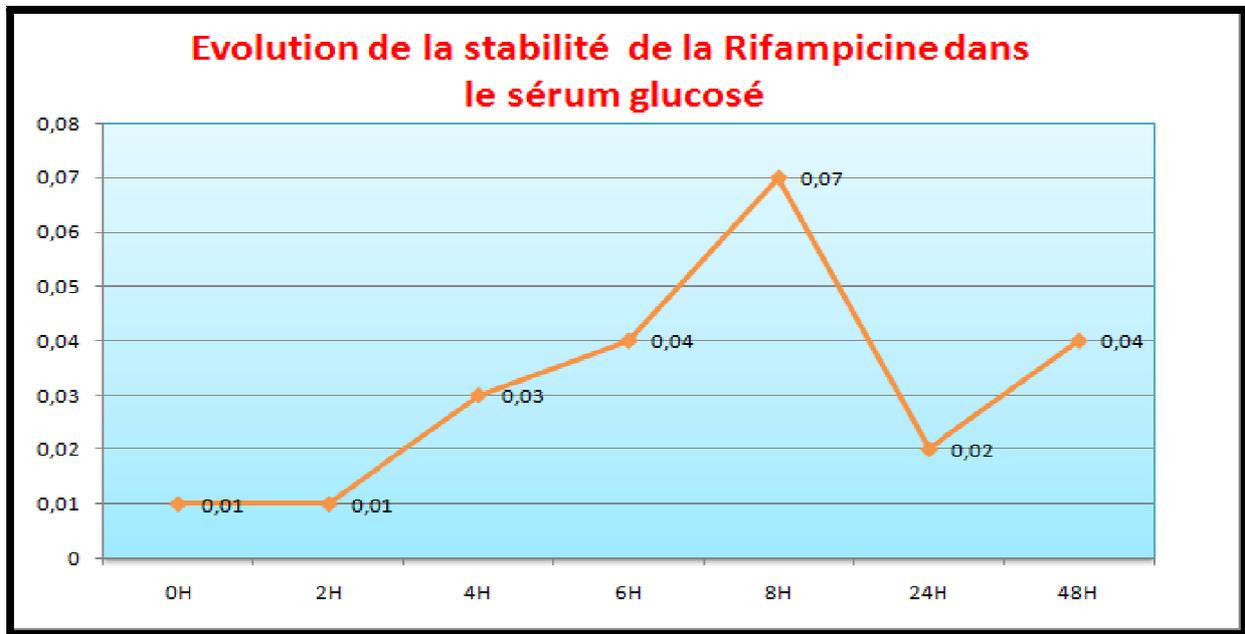


Figure 18 : courbe de variation de la stabilité de la RMP dans le sérum glucosé

Interprétations :

Les résultats de cette courbe montrent qu'il y a une faible solubilité de la rifampicine dans le sérum glucosé. (Seulement 10% de la RMP qui est soluble). Aussi la RMP a resté stable dans le sérum glucosé que 2 heures. Après on remarque une forte augmentation de la concentration de la solution examinée. Cette augmentation peut être due à la formation d'un produit de dégradation provoqué par l'interaction du glucose avec les fonctions qui se trouvent dans la molécule de la RMP. C'est une glycolysation (O-glycolysation ou N-glycolysation ou C-glycolysation). donc on peut dire que la RMP n'est pas stable ni soluble dans le sérum glucosé.

II. CONCLUSION :

La surveillance régulière de l'activité des antituberculeux est considérée comme un moyen objectif pour évaluer l'efficacité d'un Programme National de Lutte contre la tuberculose. En effet, lorsqu'il s'agit d'antituberculeux, la qualité et l'activité de ces médicaments sont primordiales pour assurer l'efficacité nécessaire au traitement.

La perte de stabilité peut avoir des diverses conséquences néfastes sur la qualité des médicaments. En effet, elle peut causer une perte d'activité du médicament. Il s'agit souvent

d'une conséquence majeure. Un médicament est en général considéré comme inacceptable en terme de qualité lorsqu'il réside moins de 90% de la quantité de base en principe actif.

Pour cela, Ce travail entrepris sur la rifampicine qui est un des antibiotiques antituberculeux essentiels à pour but d'étudier et de vérifier la stabilité de ce P.A dans des différents conditions(le temps ; la lumière ; la température ext....).

Selon les résultats trouvés, on peut conclure que la RMP est un P.A instable à l'exposition de la lumière. En effet au bout de 8 heures la molécule se dégrade en d'autres dérivés.

Le stockage de la RMP à des températures différentes a montré que ce médicament est instable à des températures élevées. L'étude de la solubilité de ce médicament dans diverse solution (Méthanol, eau, sérumsalé, sérum glucosé) a montré que la RMP est soluble dans le Méthanol contrairement à l'eau. Comme domaine d'application des solutions de gavage, on trouve que sérum salé est le plus adapté.

En conclusion, la RMP demande un stockage à l'abri de la lumière, à une température ordinaire (25°C) et à l'état solide (comprimés ou gélule) à l'abri de l'air.

La préparation de la RMP en solution doit se faire juste avant son utilisation pour garder l'activité et l'efficacité du P.A.

BIBLIOGRAPHIE

- 1: DIOP C. Contrôle de qualité des antituberculeux majeurs utilisés par le Programme National de Lutte contre la Tuberculose.(PNT). This Pharm. n°5, Dakar, 2001,**
- 2: FEINBERGM. Organiser rationnellement les essais, une nécessité pour optimiser la préparation des échantillons. Analysais,n°23-25. 1988, 20.**
- 3 : FEINBERG M. L'assurance qualité dans les laboratoires agro-alimentaires et pharmaceutiques. Editions TEC et DOC, n°309.Paris, 1998.**
- 4 :GUEYEC.Contribution au contrôle de qualité des médicaments génériques dans les centres de santé de Dakar.Thèse Pharm.n°71, Dakar, 1996,**
- 5 : LANET J. Le médicament : éthique et réalité industrielle. La qualité pharmaceutique. Edition de santé, n°3 : 215.Paris, 1991.**
- 6 : LEHIR E., BILLET A., CARDENNE M., EUZENA A., FAUSSATA I. Guide pour l'élaboration de la manuelle qualité d'une entreprise de fabrication de médicaments : rapports d'une commission SF. STP Pharma Pratiques, vol. n°5 : 1157-1497. ISSN 1997.**
- 7 :J.M.Nivet ; Détermination statistique des limites d'acceptation de la teneur en principe actif d'un produit fini par rapport aux spécifications des médicaments.**
- 8 :P.Lotteau. Commentaire à propos de l'avis aux fabricants de spécialités Pharmaceutiques relatif à l'essai de stabilité. Rapport d'un groupe de travail de la SFSTP.n° 2-12. STP pharma 1986.**
- 9 :F.Pellerin. Suivi des métiers premiers de l'origine à l'emploi. n°5,STP pharma pratique, 2001.**
- 10:C.H.Bibart .Stability programmes in the Upjohn Company.n° 2-12,STP pharma1999.**
- 11:A.Etienne. Formulation, transpositions d'échelle et stabilité. Sc. Tech .Pharm ,Octobre2007.**
- 12 :Pharmacopéeuropéenne 2000. Efficacité de la conservation antimicrobienne.**
- 13:C.H.Bibart .Stability programmes in the Upjohn Company.STP pharma,n°2-12, 1999.**
- 14 :F.Pellerin et D.Baylocq et N.Chanon.L'étude de stabilité des médicaments. Recherche et développement pharmaceutique, n°2-1998.**

- 15:**Gallo et al.IUPAC numbering, 1974.
- 16:**Zotta, V. ChimieFarmaceutica, Ed. Medicala, Bucarest, p 201-203, 1985,
- 17:**Oniscu, C. Chimiasitehnologiamedicamentelor,p 162-164 Ed. Tehn., Bucarest, 1988,
- 18:**FarmacopeeaRomâna, p967-970. Ed.X, Ed. Medicala, Bucarest, 1993.
- 19:**goodman and Gilman's the pharmacological Basis of therapeutics, p. 1149; 8th ed ., eds.Gilman, A.G.et al.,Pergamon Press, 1990.
- 20:**Oniscu, C. Chimiasitehnologiamedicamentelor, Ed. Tehn., Bucarest, 1988,p 162-164.3. FarmacopeeaRomâna, Ed.X, Ed. Medicala, Bucarest, 1993, 967-970.
- 21:**the merck index 12 :8382 /Gallo, G.G and Radaelli ;
- 22:**P Anal.Profiles of drug Subs,K Florey ,ed Academic Press , NY,5,467,1976.
- 23:** Gallo, G.G and Radaelli ; P Anal.Profiles of drug Subs,K Florey , ed Academic Press , NY,5,467,1976/ Clarke's isolation and identification of drugs , ed, eds. Moffatt, A.C. et al. p960,
- 24 :**résumé des caractéristiques du produit. Site web ANSM.Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé.
- 25:** Wehrli W. Rifampin: Mechanism of action and resistance. Rev Infect Dis 1983; 5,407-11.
- 26 :**Acocella G. Pharmacokinetics and metabolism of rifampin in human. Rev Infect Dis ,p428-32. 1983.
- 27:**Sigma quality control data.
- 28:**Karlson, A.G and Ulrich, J.A., Appl. Microbiol., 18, 692, 1969.
- 29:**Gallo, G.G and Radialli , the Merck Index 12:83-82.; P Anal.Profiles of drug Subs,K Florey , ed Academic Press , NY,5,467,1976/.
- 30:** OMS. Programme Mondial de lutte contre la tuberculose Principes généraux d'une lutte antituberculeuse efficace OMS, WHO/TB/1994 : 79
- 31:**AIT-KHALED N. et ENARSON D. Tuberculose. Manuel pour les étudiants en Médecine.

OMS-UICTMR, 1999, WHO/CDS/TB/9, 272: 99-109.

32 :M.C. Benjelloun,Pathologie respiratoire 2011 ; Tuberculose p :13

33 : le traitement de la tuberculose. Principes à l'intention des programmes nationaux.

Troisième édition .Organisation mondiale de la Santé – Genève 2003. WHO/CDS/TB/2003.313.

34:DIOP C. contrôle de qualité des antituberculeux majeurs utilisés par le Programme National de Lutte contre la Tuberculose.(PNT).Thèse Pharm., Dakar, 2001, n°05.

35 :F.GUEDIRA, Um5a_fsr/ Filière SMC/ S4/ Module 14/ Cours de Spectroscopie/ Chapitre III/

36 :Giraut C, Sarrut B. Tables d'utilisation des médicaments,
4e Ed, Paris : Frison Roche 1998.

37 : Voigt R. Pharmazeutische Technologie.

9e Ed, Stuttgart: DAV, 2000.

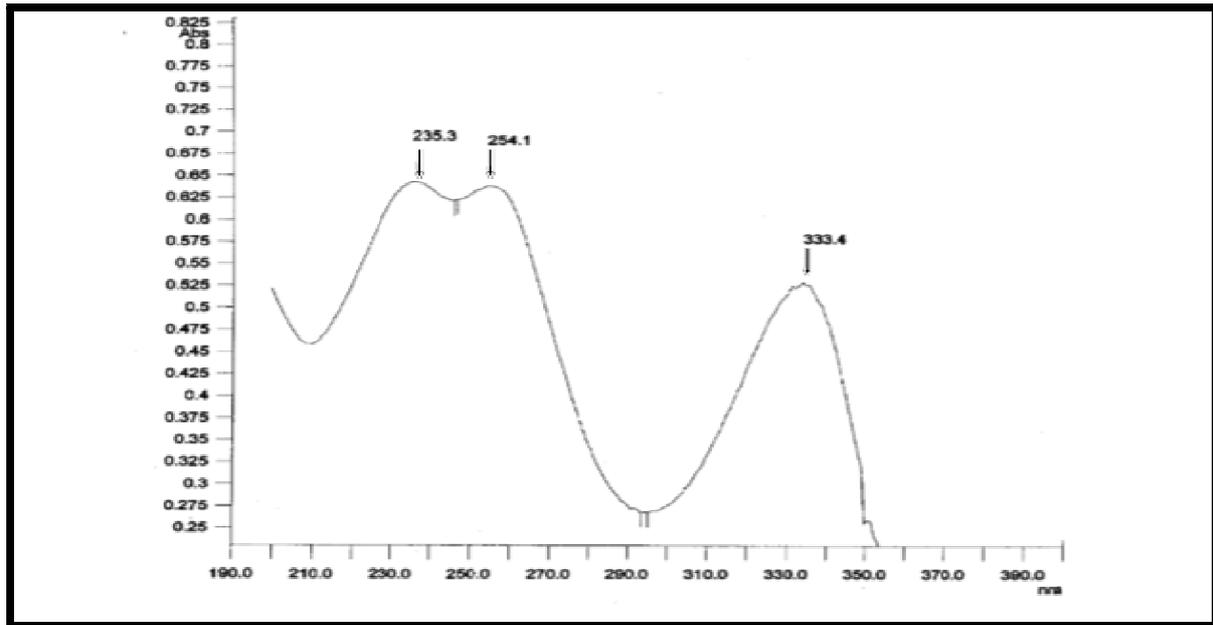
38:J Parenter Enter Nutr,Dupertuis YM et al. Physical Characteristics of total parenteral nutrition bags significantly affect the stability of vitamins C and B1.1999; 26:310-16

39:La Commission d'Autorisation de Mise sur le Marché.n°372/ Afssaps, décembre 2009.

40: YU-JEN CHEN, THE SOLUBILITY ENHANCEMENT AND THE STABILITY ASSESSMENT OF RIFAMPICIN, ISONIAZID AND PYRAZINAMIDE IN AQUEOUS MEDIA. Of RHODES UNIVERSITY.2000

ANNEXES

ANNEXE 1: Spectre UV-VIS de la rifampicine. [40]



ANNEXE 2: La procédure de l'appareil de l'UV.

A-Démarrage du programme :

1. Démarrer le programme [spectra Manager]
2. Double-cliquer sur [quantitative Analysais]

Un message «under initialisation » apparait, signalant que les paramètres sont en cours de transfert vers le spectrophotomètre.

3. La fenêtre [quantitative Analysais] s'ouvre.

B-Création de la courbe d'étalonnage :

1. Exécuter [File]-[New...]
2. Cliquer sur «New » pour ouvrir la fenêtre des paramètres.
3. Vérifier les paramètres 'Weavelength,simple N°, peak...)
4. OK pour transférer les paramètres vers le spectrophotomètre « CalibrateCurveParameters » s'ouvre.
5. Garder Calibcuvre sur [Proportional]
6. Cliquer sur [std #01]
7. Taper la valeur de la concentration dans [Conc.] puis cliquer sur « append »
La valeur de la concentration s'affiche et le curseur passe automatiquement à la ligne suivante.
8. Répéter les étapes 6 et 7 pour tous les points de l'étalon.
9. Cliquer sur [std#01].
10. Cliquer sur « start... ».la boite de dialogue [Quantitative Measurement] s'ouvre.
11. Pour mesurer le Blanc Standard :
 - a. Sélectionner l'option [Blank]
 - b. Placer la cuve Blanc Standard dans la chambre Echantillon.
 - c. Cliquer « start ». le Blanc Standard est mesuré et sa valeur est automatiquement ajouté dans [Standard Blank] de [CalibrateCurveParameters].
12. Pour mesurer le Standard Echantillon :
 - a. Cliquer sur [std#01] pour ramener le curseur à la première ligne.
 - b. Placer l'échantillon Standard dans la chambre Echantillon.
 - c. Cliquer « start ». La valeur de l'absorbance apparait automatiquement dans la fenetre [CalibrateCurveParameters], Le champs [Use] passe de [---] à [Use].
Le curseur passe automatiquement à la ligne suivante.
 - d. Répéter les étapes b et c pour chaque Standard Echantillon.
 - e. Cliquer sur « Close » pour fermer la boite de dialogue [Quantitative Measurment]
13. Exécuter [Method]-[Save As] pour sauvegarder le fichier Méthode (du courbe étalon)

Sous le nom de la molécule à doser.

MST Chimie des Molécules Bio Actives – RAJI OUIAME

C. Dosage d'une Echantillon Inconnu :

1. Exécuter [Measurement]-[Measurment...].
2. Pour mesurer le Blanc Echantillon.
 - a. Cocher l'option [Blank].
 - b. Cliquer « Start ». Le Blanc Echantillon est mesuré.
3. Pour mesurer l'Echantillon :
 - a. Sélectionner l'option [Sample].
 - b. Placer la cuve contenant l'échantillon dans la chambre du spectro.
 - c. Cliquer « Start ».la concentration de l'échantillon est calculée sur la base de la courbe de calibration et le résultat est affiché.
 - d. Répéter les étapes b et c pour tous les échantillons.

ANNEXE 3: La pharmacopée européenne.