Université Sidi Mohamed Ben Abdellah

Faculté Des Sciences Et Techniques

– Fès –

Licence en Sciences & Techniques : Sciences Biologiques appliquées et Santé

Projet De Fin D'études

Validation Analytique Du Dosage De La Rifampicine Par Spectrophotomètre UV-Visible

Présenté et soutenu par:

KHADRI Badr-Eddine

Encadré par:

Pr. Omar EL FARRICHA, FST Fès

Pr. Youssef KHABBAL, CHU Fès - FMP

Soutenu Le 17 Juin 2015 devant le Jury composé de:

Pr. EL FARRICHA Omar

Pr. KHABBAL Youssef

Pr. BENCHEMSI Najoua

Année Universitaire 2014-2015

Présentation du lieu de stage

La Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès instituée par le Décret n° 2-94- 130 du 13 Hijja 1414 (24 Mai 1994) modifiant et complétant le Décret n°2-90- 554 du 2 Rajab 1411 (18 Janvier 1991) relatif aux établissements et aux cités universitaires. Cette faculté est un établissement dépendant de l'Université Sidi Mohammed Ben Abdellah.

Elle a été inaugurée par SA MAJESTÉ LE ROI MOHAMMED VI le 20 octobre 1999. Sa création vise essentiellement à:

- Décentraliser l'enseignement médical et améliorer son niveau;
- Créer parallèlement le centre hospitalier HASSAN II pour la formation et les soins de niveau tertiaire;
- Initier la recherche clinique et créer des pôles d'excellence;
- Favoriser ultérieurement l'implantation des médecins dans leur région pour une couverture médicale homogène du Royaume.

Laboratoires

- Anatomie
- Anatomie Pathologique
- Biochimie
- Immunologie
- Biophysique
- Epidémiologie

- Hématologie
- Histologie
- Microbiologie
- Parasitologie
- Pharmacologie
- Physiologie

Présentation du Laboratoire "Pharmacologie"

Equipements

- Hotte pour culture cellulaire
- Incubateur pour cellules
- Microscope
- Balance électronique
- Spectrophotomètre
- Étuve
- Bain marie
- Congélateur -80
- Réfrigérateur
- Vortex
- PH-mètre
- Certains matériels de pharmacologie expérimentale

Locaux

- Une petite pièce
- Une salle de travaux dirigés
- Deux pièces (laboratoires)
- 4 bureaux

Introduction

Près d'un tiers de la population mondiale, soit deux milliards d'individus, est infecté par *Mycobacterium tuberculosis*, plus de huit millions de personnes développent une tuberculose évolutive chaque année. En 2013, neuf millions de personnes ont développé la tuberculose et 1,5 millions en sont mortes. [1]

La tuberculose est causée par une bactérie *Mycobacterium tuberculosis* qui touche le plus souvent les poumons. Elle se propage d'une personne à l'autre par voie aérienne. Lorsque les personnes atteintes de tuberculose pulmonaire toussent, éternuent ou crachent, elles projettent les germes de la tuberculose dans l'air. Il suffit d'en inhaler seulement quelques-uns pour être infecté.

Près d'un tiers de la population mondiale est actuellement atteinte de tuberculose latente, ce qui signifie que les personnes ont été infectées par la bactérie de la tuberculose mais n'ont pas (encore) développé la maladie et ne peuvent donc pas la transmettre. Chez les personnes infectées par le bacille tuberculeux, le risque de développer la maladie au cours de l'existence est de 10%. Toutefois, les personnes dont le système immunitaire est affaibli, telles que les personnes vivant avec le VIH, les personnes souffrant de malnutrition ou de diabète, ou encore les fumeurs, courent un risque beaucoup plus élevé de développer la maladie. Lorsqu'une personne développe une tuberculose active , les symptômes (toux, fièvre, sueurs nocturnes, perte de poids, etc.) peuvent rester modérés pendant de nombreux mois. Cela peut inciter le malade à repousser le moment de consulter, et se traduire par la transmission de la bactérie à d'autres personnes. Sans un traitement approprié, jusqu'à deux tiers des personnes atteintes de tuberculose évolutive en mourront. [2]

C'est ainsi que la rifampicine fut découverte en 1959 dans les laboratoires Lepetit, à Milan, par un groupe de chercheurs italiens dirigés par Maria Teresa Timbal (1925-1969) et Piero Sensi (né en 1920). Cette découverte de la rifampicine est le résultat de deux années de recherche qui ont suivi l'analyse, en 1957, de bactéries provenant d'un sol de la Côte d'Azur, l'activité antibactérienne de la rifampicine est rapide ce qui a permis d'écourter le traitement de 18 à 6 mois. [3]

Près de 37 millions de vies ont été sauvées entre 2000 et 2013 grâce au diagnostic et traitement de la tuberculose.

❖ But du travail

Le traitement par ces médicaments présente souvent une efficacité thérapeutique. Des effets indésirables sont observés notamment l'hépato-toxicité. Ces effets sont souvent liés aux doses administrées non adaptées de ces médicaments. Le suivi thérapeutique par le dosage de médicaments permet d'ajuster la posologie à chaque patient pour mieux optimiser le traitement et minimiser le risque d'effet indésirable. Le dosage de la rifampicine qui s'inscrit dans le cadre du suivi thérapeutique adapté par le laboratoire du Centre Hospitalier Hassan-II est réalisé par spectrophotomètre UV-visible.

L'objectif de ce travail, est le dosage de la rifampicine dans l'urine pour le suivi thérapeutique afin d'offrir aux cliniciens un outil pratique pour améliorer l'efficacité du traitement. Ce projet porte essentiellement sur la validation du dosage de la rifampicine par spectrophotométrie.

PREMIERE PARTIE: PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les Antibiotiques

1. Définition

La véritable révolution dans le domaine des maladies infectieuses a été la découverte des antibiotiques. En effet, le traitement par antibiotique ou l'antibiothérapie a sauvé un très grand nombre de vies tant humaines qu'animales. L'utilisation des antibiotiques a donné alors un espoir à l'homme de contenir un jour les maladies infectieuses. Ainsi, le large choix d'antibiotiques aujourd'hui disponibles permet de traiter la plupart des infections bactériennes.

2. Qu'est-ce qu'un antibiotique ?

Les antibiotiques sont des substances naturelles produites par des bactéries du sol et certains champignons qui, à faibles concentrations, agissent sur d'autres bactéries sans être toxiques pour l'homme. Initialement "toute substance chimique produite par des micro-organismes ayant le pouvoir d'inhiber et même de détruire les bactéries et autres micro-organismes", les antibiotiques sont également obtenus en laboratoire par synthèse ou semi-synthèse.

Ces antibiotiques ont une origine naturelle s'ils sont extraits d'organismes vivants. Ils peuvent aussi être obtenus par synthèse chimique totale ou partielle. Chaque antibiotique possède un mode d'action spécifique. En fonction de leur concentration et du temps de contact avec les bactéries, ils peuvent tuer les bactéries (effet bactéricide) ou ralentir leurs croissances (effet bactériostatique).

3. Les modes d'action des antibiotiques (Figure 1)

Un antibiotique est efficace contre les bactéries mais pas contre les virus. Donc, dans une maladie virale, comme la rhinopharyngite ou la grippe, on donne des antibiotiques pour traiter une surinfection bactérienne, mais pas contre le virus lui-même.

Ces antibiotiques agissent à des niveaux particuliers pour détruire ou empêcher la multiplication des germes. Selon la molécule antibiotique où le germe est combattu, c'est au niveau de la paroi bactérienne, de la membrane cytoplasmique, du chromosome, ou des ribosomes que se déroulent les mécanismes aboutissant au contrôle de l'infection. [4]

Ces médicaments répondent à cinq grands mécanismes d'action. Ils peuvent ainsi :

- ✓ perturber la formation de la paroi bactérienne: pénicillines, céphalosporines;
- ✓ agir au niveau de la membrane cytoplasmique: polymyxines.
- ✓ inhiber la synthèse protéique : chloramphénicol, streptomycine, tétracycline;
- ✓ bloquer la réplication de l'ADN bactérien: quinolones, ou la synthèse de l'ARN: rifampicine;
- ✓ modifier le métabolisme énergétique de la bactérie : sulfamides.

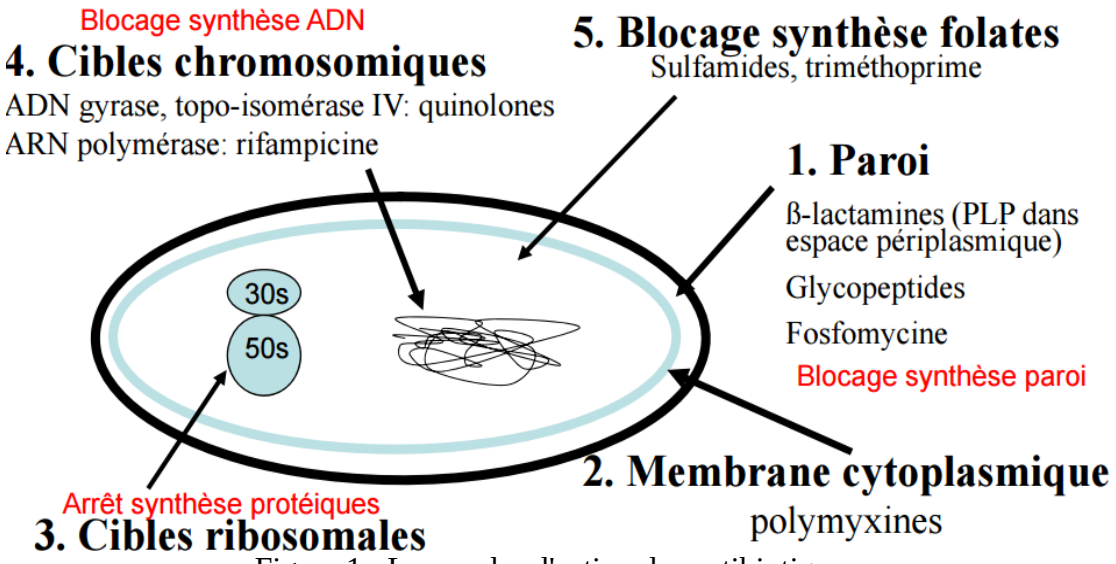


Figure 1 : Les modes d'action des antibiotiques

II. La rifampicine

1. Définition

La rifampicine est un produit semi-synthétique, dérivé d'un composant naturel la rifamycine qui est produite par la bactérie « *Streptomyces mediterranei* ». La rifampicine a une apparence en poudre orange-brun à rouge-brun sa formule brute est : $C_{43}H_{38}N_4O_{12}$.

Figure 2 :Solution de la rifampicine

Elle est prescrite dans les cas d'infections par le Staphylococcus ou Hemophilus influenzae et dans les méningites résistantes à la sulfonamide (Composé organique utilisé pour ses propriétés antibiotiques dans la préparation de médicaments « bloque la synthèse des folates »). [5] Sa cible est l'ARN polymérase mycobactérienne: elle inhibe l'élongation de l'ARN alors que le début de la transcription n'est pas affecté.

Elle est utilisée par voie orale ou injectable notamment dans la tuberculose en association avec les antituberculeux majeurs, isoniazide, pyrazinamide et ethambutol. [6]

2. Structure chimique

La rifampicine est une molécule lipophile, ce qui lui assure une bonne diffusibilité au travers des membranes. Elle comporte deux cycles aromatiques reliés par une longue chaîne (ou "anse", à l'origine du nom de cette classe d'antibiotiques) et qui confère un caractère rigide à la molécule.

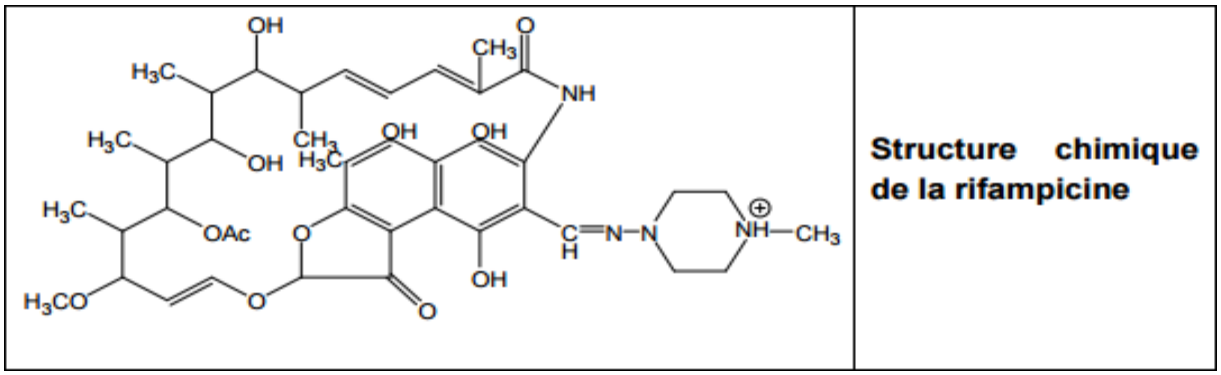


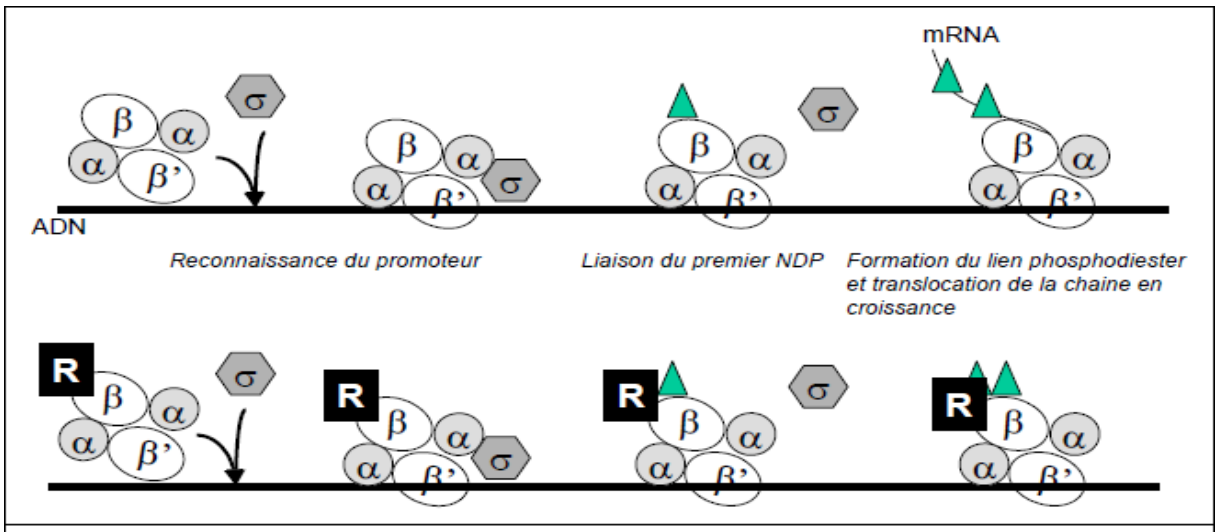
Figure 3 : Structure chimique de la rifampicine

3. Mode d'action (Figure 4)

La rifampicine est une molécule qui peut inhiber l'ARN polymérase par la formation d'un complexe stable avec cette dernière et en inhibant ainsi la transcription des ARN messagers des bactéries.

La rifampicine inhibe spécifiquement l'ARN polymérase bactérienne en formant un complexe avec cet enzyme qui comporte 5 sous-unités: 2 sous-unités α établissant le contact avec les facteurs de transcriptions de l'ADN, une sous-unité β' liant l'ADN, une sous-unité β constituant le site actif proprement-dit et un facteur σ n'intervenant que dans l'initiation de la transcription.

La rifampicine se lie par des interactions hydrophobes au niveau de son "anse" à la sous-unité β, empêchant la transcription de l'ADN en ARNm et entraînant ainsi une réduction de la synthèse protéique. [7]



Synthèse de l'ARNm par l'ARN polymérase (panneau supérieur) et inhibition par la rifampicine (carré noir; panneau inférieur).

L'ARN polymérase comporte 4 sous-unités, parmi lesquelles β' se lie à l'AND et β se lie au ribonucléotide diphosphate (NDP; triangle). Le facteur σ participe uniquement à l'initiation en permettant la reconnaissance par l'enzyme de séquences promoteurs sur l'ADN.

La rifampicine se lie à la sous-unité β. Elle n'interfère pas avec la liaison du nucléotide diphosphate, mais empêche l'initiation de la transcription, en inhibant soit la formation du premier lien phosphodiester, soit, plus probablement, la réaction de translocation du dinucléotide nouvellement synthétisé.

Figure 4 : Effet de la rifampicine sur l'ARN Polymérase bactérienne

4. Activité de l’antibiotique

Ceci conduit donc à une activité bactéricide à la fois intra et extra cellulaire qui peut donc agir sur les bacilles résistants à développement lent ayant pénétré dans les cellules et les tissus.

La rifampicine peut atteindre ces bacilles intracellulaires car il s'agit d'une molécule:

- de **petite taille**
- assez **lipophile**

5. Propriétés

Elle a un spectre assez large, en effet cette molécule est assez souvent utilisée dans le cadre du traitement d'infections à coccies gram + dont les infections à staphylocoques et sa pénétration intra cellulaire reste un avantage particulier.

Se fixant directement à l'ARN polymérase bactérienne, 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.[8] 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. [9]

6. Effets secondaires

La rifampicine induit une toxicité hépatique réversible à l'arrêt du traitement. Elle peut causer des réactions immunologiques lors d'un traitement intermittent, dont les symptômes mineurs tendent à régresser par une administration régulière du médicament.

L'apparition de symptômes majeurs (atteinte hématologique, atteinte rénale) doit cependant conduire à l'arrêt du traitement. Il faut également citer le nombre non négligeable d’interactions médicamenteuses de la rifampicine qui, comme puissant inducteur enzymatique, diminue la demi-vie de nombreuses substances comme les glucocorticoïdes et les contraceptifs oraux.

La rifampicine colore les urines et les sécrétions lacrymales (couleur acajou). [10]

7. Resistance à la rifampicine

- Dans tous les pays étudiés, on a constaté l'existence de souches qui résistent à un médicament antituberculeux utilisé seul.

- La résistance à la rifampicine de *Mycobacterium tuberculosis* implique des altérations de l'ARN polymérase.

- Le gène qui code pour la sous-unité β de l'ARN polymérase (rpoB) est clone, empêchant la fixation de la rifampicine.

- Les souches résistantes de micro-organismes initialement sensibles se développent moins rapidement si la rifampicine est administrée en association.

-C'est pour cela que le traitement de la tuberculose consiste de nos jours à prescrire à la fois les 4 antituberculeux : la rifampicine - isoniazide - pyrazinamide et ethambutol.[11] [12]

III. La pharmacocinétique

1. Définition

La pharmacocinétique ou « l'ADME » a pour but d'étudier le devenir d'un médicament dans l'organisme. La détermination des paramètres pharmacocinétiques d'un médicament apporte les informations qui permettent de choisir la voie d'administration et d'adapter les posologies pour son utilisation future.

On peut distinguer schématiquement 4 étapes dans la pharmacocinétique d'un médicament:

- son absorption
- sa diffusion dans l'organisme
- son métabolisme
- son élimination de l'organisme

2. Le devenir de la rifampicine [13] [14] [15]

a. L'absorption

L'absorption est le processus par lequel le médicament inchangé passe de son site d'administration à la circulation générale « site de mesure ». La voie d'administration du médicament influence cette première phase: la voie intraveineuse est la voie de référence puisque par définition, à la différence des autres voies (orale par exemple) toute la dose administrée atteint la circulation générale. La rifampicine est facilement absorbée à partir de l'estomac et du duodénum. La résorption est de 100%.

Des concentrations sériques maximales de l'ordre de 10µg/ml apparaissent environ 2 à 4 heures après administration d'une dose de 10 mg/kg de poids corporel sur un estomac vide. Après administration répétée, par voie orale, les concentrations maximales(Cmax) moyennes avoisinent 14µg/ml et 18µg/ml pour des prises uniques quotidiennes respectivement de 600mg et 900mg. Le délai d'obtention du pic (Tmax) est 1,62 ±0.5 h pour une dose orale de 600mg, l'Air sous la Courbe est égale à 57.2µg/ml.

L'administration d'une perfusion intraveineuse continue de rifampicine sur 1–3 heures permet d'obtenir des profils plasmatiques comparables à ceux obtenus après l'administration orale des mêmes doses sous forme de capsules ou de comprimés. Des concentrations plasmatiques maximales d'environ 10 µg/ml sont obtenues avec une perfusion de 600 mg en l'espace de 3 heures. L'absorption de la rifampicine est réduite lorsqu'elle est ingérée avec de la nourriture.

b. Distribution

La rifampicine est liée à 80% aux protéines plasmatiques, principalement à l'albumine. Le volume de distribution Vd=1.6l/kg chez l'adulte et de 1,1 l/kg chez l'enfant traduit une bonne diffusion tissulaire. La rifampicine est présente à forte concentration dans la bile car elle subit un recyclage entérohépatique.

Elle diffuse bien dans le liquide pleural et le tissu pulmonaire. Sa bonne diffusion intracellulaire explique des concentrations intramacrophagiques deux fois supérieures aux concentrations sériques.

Le passage placentaire est important, les concentrations dans le sang du cordon sont voisines de 33 à 50% des concentrations sériques maternelles mais passe peu dans le lait maternel.

c. Métabolisme

Le terme de métabolisme fait référence à la transformation, par une réaction enzymatique d'un médicament en un ou plusieurs autres composés actifs ou inactifs au plan pharmacologique. De nombreux tissus peuvent réaliser cette transformation (peau, poumon, rein, intestin...).

Néanmoins le principal site de biotransformation est situé au niveau hépatique. Ceci est expliqué par le flux sanguin très important du foie, par rapport aux autres organes. Les hépatocytes contiennent un grand nombre d'enzymes impliquées dans la transformation des médicaments, en particulier les réactions d'oxydoréductions et d'hydroxylations.

La rifampicine est principalement métabolisée dans le foie, essentiellement en 25-0-désacétylrifampicine, métabolite actif. Le métabolite subit, comme la rifampicine inchangée, un cycle entérohépatique. Par son effet d'induction enzymatique au niveau du foie, la rifampicine accélère son propre métabolisme.

d. L'élimination

L'élimination de la rifampicine se fait principalement par voie biliaire après biotransformation dans le foie. La demi-vie du médicament, voisine de 3 heures au début du traitement, décroît progressivement pour atteindre une valeur de plateau de 2 heures après 15 jours. Cet effet est lié à la capacité de la rifampicine à induire les enzymes hépatiques responsables de son propre métabolisme.

IV. Protocole de validation d'une méthode analytique

1. Définition et objectif de la validation

La Validation d'une méthode est la procédure par laquelle on démontre, preuves expérimentales à l'appui, que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. Il faut donc démontrer que la méthode mise en œuvre par le laboratoire est apte à l'emploi prévu.

La validation est donc fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables. [16]

2. Critères de la validation

La validation d'une méthode analytique consiste à vérifier certains critères à savoir :

- Spécificité
- Linéarité
- Fidélité
- Justesse
- Limite de détection
- Limite de quantification

❖ Spécificité

Capacité d'une méthode d'analyse à déterminer le principe actif contenu dans un médicament.

❖ Linéarité

Capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une valeur d'information ou des résultats proportionnels à la quantité en analyste à doser dans l'échantillon pour le laboratoire. Elle permet de donner des informations sur la sensibilité. Cette dernière est l'aptitude de la méthode à détecter de petites variations de concentration. Elle se définie comme étant la pente de la courbe d'étalonnage.

❖ Fidélité

La fidélité, à un niveau donné, correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises dans des conditions déterminées. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de répétabilité et de reproductibilité.

- Répétabilité

La répétabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont au moins l'un des éléments suivants est différent : l'analyste, l'appareil, le jour.

- Reproductibilité

La reproductibilité, à un niveau donné, correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes : analyste différent, appareil différent, jour différent ou même jour.

❖ Justesse

Etroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée. Elle indique sur quel point la concentration observée approche la valeur réelle, elle est exprimée en valeur absolue.

❖ Limite de détection

La limite de détection d'une méthode est la plus basse concentration pour un composé analysé dans une matrice réelle qui, lorsqu'il subit toutes les étapes d'une méthode complète, incluant les extractions chimiques et le prétraitement, produit un signal détectable avec une fiabilité définie statistiquement différent de celui produit par un « blanc » dans les mêmes conditions. Pour l'estimer, on peut calculer la concentration équivalente à 3 fois l'écart type d'un étalon à bas niveau dans un solvant approprié.

$$LD = 3S$$

S : l'écart type

❖ Limite de quantification

La limite de quantification d'une méthode est la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie. C'est la concentration équivalente à 10 fois l'écart type obtenu lors de l'établissement de la LD. **[17]**

$$LQ = 10*S$$

V. Dosage spectrophotométrique

Un dosage a pour but de déterminer la concentration molaire d'une espèce (molécule ou ion) en solution. Les méthodes de dosage sont très nombreuses : la technique est évidemment adaptée à l'espèce à doser. On distingue :

- ✓ les dosages acido-basiques
- ✓ les dosages colorimétriques (acido-basiques ou d'oxydoréduction)
- ✓ les dosages d'oxydoréduction
- ✓ les dosages par précipitation ou complexation

- ✓ les dosages conductimétriques
- ✓ les dosages **spectrophotométriques** (par étalonnage)

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative destinée à réaliser des dosages ou permettre des suivis quantitatifs de réactions en vue d'étudier, par exemple, des cinétiques de réaction.

La spectrophotométrie est aussi une technique d'analyse qui repose sur l'absorption de la lumière par les espèces chimiques colorées. Une solution est colorée si elle absorbe une partie des radiations de la lumière blanche, la couleur perçue résultant de la superposition des teintes des radiations non absorbées.

1. Description de spectrophotomètre UV-visible (jasco530)

La spectrophotométrie utilise le photomètre permettant de mesurer l'intensité d'un faisceau de lumière en fonction de sa couleur (longueur d'onde) connue sous le nom des spectrophotomètres.

Un certain nombre de méthodes quantitatives décrites font appel à la spectrophotométrie dans l'Ultra Violet (UV : 200-400 nm) ou le Visible (400-800 nm). Le spectrophotomètre peut être à simple faisceau ou à double faisceau. Dans un instrument à simple faisceau, le rayonnement provenant de la source lumineuse passe dans un monochromateur puis traverse la cuve contenant l'échantillon avant d'atteindre le détecteur.

Dans un instrument à double faisceau, le rayonnement lumineux sortant du monochromateur passe par un dispositif qui le divise en deux faisceaux, dont l'un traverse la cuve contenant l'échantillon et l'autre traverse la deuxième cuve contenant la substance de référence, avant d'atteindre le détecteur.

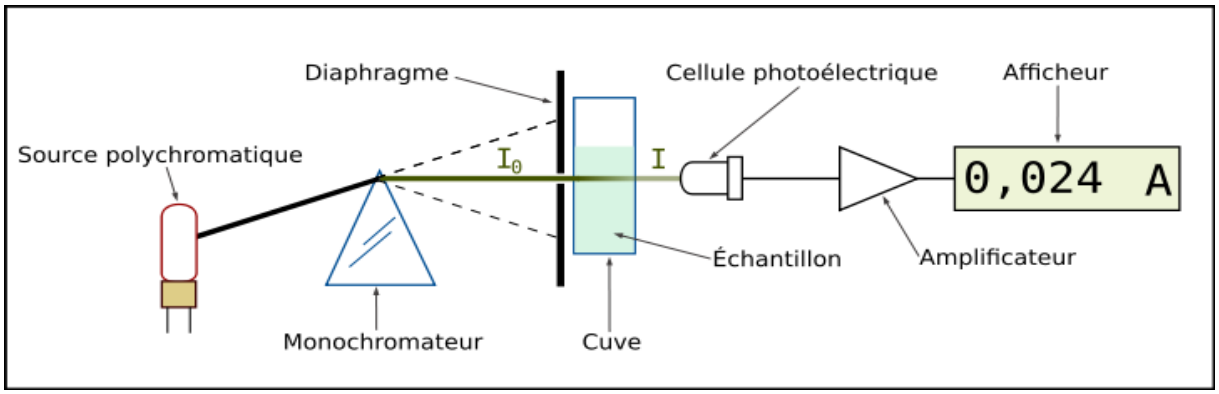


Figure 5: Shéma présentatif du spéctrophotométre UV-visible

2. La loi de Béer-Lambert

Le procédé le plus souvent utilisé de manière quantitative pour déterminer les concentrations d'une espèce d'absorption en solution, en utilisant cette loi:

$$A = \log_{10}(I_0/I) = \epsilon cL$$

Avec:

-A : la mesure d'absorbance

-I0 : l'intensité de la lumière incidente à une longueur d'onde donnée

-I : l'intensité transmise

-ε : constante connue sous le nom absorptivité molaire ou coefficient d'extinction

-c : la concentration des espèces absorbantes

-L : la longueur du chemin à travers l'échantillon

3. Principe de l'absorption UV-visible (Figure 5)

En spectrophotométrie, nous mesurons, grâce aux propriétés physico-chimiques, l'absorbance des échantillons (solutions, gaz…). Lorsqu'un rayon de lumière polychromatique, comme la lumière blanche d'une ampoule, traverse l'échantillon. Celui-ci va absorber une partie des radiations et de ce fait résulte la couleur telle que nous l'observons à l'œil nu.

Le faisceau issu de la source est envoyé vers un monochromateur puis vers un rupteur qui envoie alternativement le faisceau vers la cuve de référence puis vers la cuve contenant l'échantillon.

Un système de miroir permet d'envoyer ces deux faisceaux vers le même capteur qui reçoit donc alternativement le faisceau de puissance de référence et le faisceau de puissance transmis par l'échantillon. Le signal du capteur est alors traité par un microprocesseur qui permet d'afficher la transmittance ou l'absorbance.

Figure 6: Spectrophotomètre UV-visible (jasco 530)

DEUXIEME PARTIE: PARTIE PRATIQUE

I. Matériel

1. Réactif

Principe actif utilisé :

- ✓ La Rifampicine

Solvants :

- ✓ Méthanol
- ✓ Eau distillé
- ✓ Urine
- ✓ Solution tampon phosphate 7.4

Préparation du tampon phosphate 0,1 m avec un ph=7,4

Phosphate monosodique : m (NaHPO4) = 3,1g

Phosphate disodique : m (Na2HPO4)= 10,9g

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.

2. Appareillage

- Micropipette et tube
- Congélateur
- spectrophotomètre UV-visible (jasco 530)
- Agitateur vortex

II. Mode opératoire du dosage de la rifampicine par UV-visible

Pour le dosage de la rifampicine nous avons adopté la méthode décrite dans la pharmacopée Européenne. Disposant d'un échantillon de la rifampicine 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

-Complétez à 50 mL avec la solution tampon phosphate pH 7,4

- Blanc utilisé : 1ml du Méthanol +4ml du tampon phosphate ph7,4
- Maximums d'absorption : à 475nm

Dans le cas du dosage de la rifampicine des urines des patients : 1ml d'urine est complétée à 50ml avec du tampon phosphate pH=7.4, puis la densité optique est lue au spectrophotomètre à 475nm.

La concentration de la rifampicine dans l'urine est déduite à partir de la gamme d'étalonnage.

III. Résultats et discussion

Pour valider notre méthode « dosage de la rifampicine », généralement on doit valider les 6 critères en se basant sur les différents tests statistiques.

On ce qui concerne notre étude, il suffit de vérifier les 3 critères suivants:

- Linéarité
- Fidélité
- Justesse

1. Vérification de la linéarité

Préparation de la gamme d'étalonnage

Pour vérifier la linéarité, on doit d'abord effectuer une courbe d'étalonnage en utilisant la loi de Beer-Lembert. Pour le traçage de cette droite, on a préparé des solutions étalons par dilution à partir de la solution mère. Les absorbances des solutions sont ensuites lues grâce au spectrophotomètre UV.

Concentrations(µg/ml)	Absorbances(475nm)
8	0,0145
15	0,0302
25	0,0839
35	0,1152
45	0,1659
65	0,2625
100	0,3889

Tableau 1: Les concentrations de la rifampicine et leurs absorbances

Les concentrations en fonction de leurs absorbances sont calculées à partir du spectrophotomètre UV qui nous a permis de dessiner notre droite d'étalonnage.

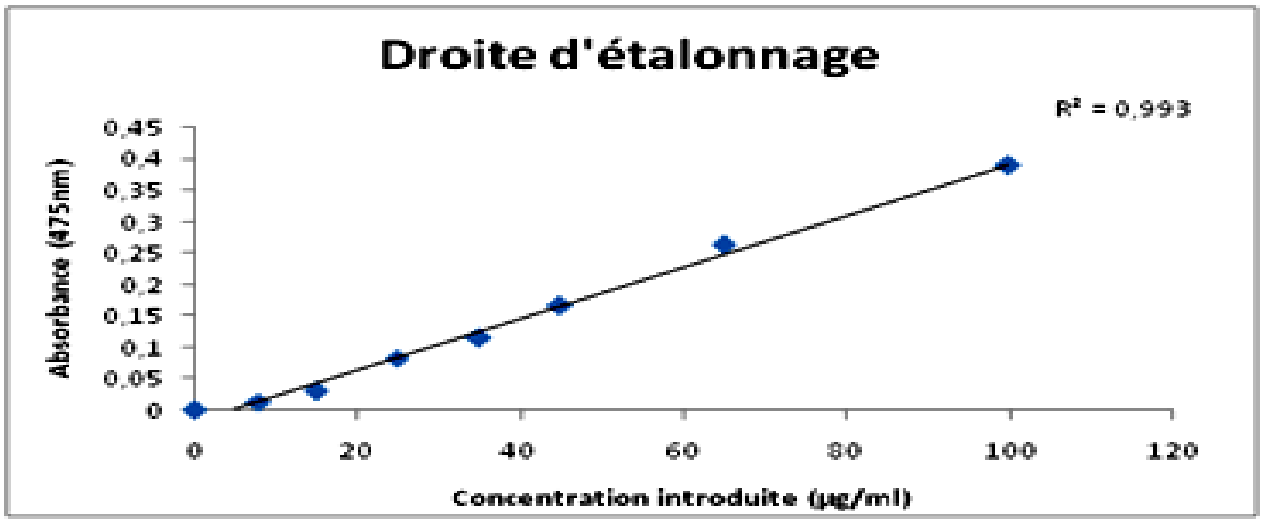


Figure 7 : La Gamme d'étalonnage de la rifampicine

- Coefficient de détermination R^2

Le coefficient de détermination (R^2) est un indicateur qui permet de juger la qualité d'une régression linéaire, il représente l'ajustement des points par rapport à la droite. Sa valeur est calculée à partir de l'équation suivante:

$$R^2 = \frac{[n\sum xy - (\sum x)(\sum y)]^2}{(n\sum x^2 - (\sum x)^2)(n\sum y^2 - (\sum y)^2}$$

Avec:

x : les concentrations

y : l'absorbance

A partir du coefficient de determination et de cette courbe, on peut conclure que notre linéarité a été bien vérifiée.

2. Vérification de la fidélité

La vérification de la fidélité est basée sur l'application des différents tests statistiques. Pour notre étude, on a choisi d'effectué des séries de 6 mesures pendant 4 jours et le tableau(2) ci-dessous représente les résultats obtenus.

Absorbance	Abs1	Abs2	Abs3	Abs4	Abs5	Abs 6	Moyenne	Moyenne Totale	Variance	Écart type	Écart type totale
Série 1	0,9542	0,9423	0,8951	0,9021	0,9356	0,9421	0,9286	0,9140	0,00058	0,02407	0,036425
Série 2	0,8974	0,889	0,9254	0,9156	0,8997	0,8951	0,9037		0,000192	0,013843	
Série 3	0,8976	0,9462	0,9351	0,9832	0,9998	0,9651	0,9545		0,001334	0,036526	
Série 4	0,8654	0,8754	0,8698	0,8521	0,8732	0,8783	0,8690		0,000089	0,009426	

Tableau 2 : Test de Vérification de la fidélité

➢ Test de vérification de la normalité

Démarche

1- Il faut classer les mesures obtenues par ordre croissant

2- On calcule toutes les différences et Wobs

Différences	Statistique calculée
$d_1=x_n-x_1$ $d_2=x_{n-1}-x_2$ $d_3=x_{n-2}-x_3$ $d_i=x_{n-1+1}-x_i$	$W_{obs}=\frac{(\sum_{j=1}^{j=p} a_j d_j)^2}{\sum_{i=1}^{i=n}(x_i-\bar{x})^2}$
$\bar{x}$: Moyenne des mesures aj : coefficient lus sur la table des coefficients pour n données. On choisit un risque (α=5%) et on lu dans la table de Shapiro et Wilk la valeur de W (α, n).	

Règle de décision

Si $W_{obs} > W(\alpha, n)$: on accepte l'hypothèse H_0.
Si $W_{obs} < W(\alpha, n)$: on rejette l'hypothèse de H_0.

Différences dj	Coefficient aj	Statistique calculée
d1=0.0855 d2=0.0249	a1=0.6872 a2=0.1677	Wobs=0.9940

Tableau 3: Test sur la normalité des Résultats

Pour un risque α=5% et n=4 ; **Wcrit=0.748**

Wobs >Wcrit: donc on accepte l'hypothèse

➢ Vérification des valeurs aberrantes

On a vérifié l'existence des valeurs aberrantes avec le test de Grubbs.

- **Test de Grubbs**

Test utilisé pour vérifier si la petite valeur ou la grande valeur est aberrante, on calcule les deux rapports suivants :

$$G_a = \frac{X_n - \overline{X}}{s} \qquad G_b = \frac{\overline{X} - X_1}{s}$$

Règle de décision

Si l'un des rapports est supérieur à la valeur lue dans la table au risque α, la valeur correspondante est considérée comme aberrante.

On détermine les valeurs max et min des moyennes et de la totalité des mesures après on calcule les 2 statistiques Ga et Gb et on compare ces derniers avec les valeurs triées de la table de Grubbs.

Test des moyennes		**Gobs**		**Gcrit (α =5%,p= 4)**
Max	0.9545	Ga	Gb	1.46
Min	0.8690	1.1132	1.2331	
Test des valeurs suspectes		**Gobs**		**Gcrit (α =5%,p= 24)**
Max	0.9998	Ga	Gb	2.64
Min	0.8521	2.3568	1.6979	

Tableau 4 : Test des valeurs aberrantes

On constate que les deux rapports calculés sont inférieurs à Gcrit lue dans le tableau de Grubbs avec un risque α de 5%, donc la moyenne MAX, MIN et la valeur suspecte maximale et minimale ne sont pas aberrantes.

➢ Test de Cochran

Ce test est appelé Test d'homogénéité de variance, dans ce test on va calculer la somme des variances, on détermine le max des variances et on calcule leur rapport.

- **Test de Cochran**

Test de comparaison des variances : permet de détecter la variance aberrante ou suspecte.
La statistique calculée est

$$C_{obs} = \frac{S^2_{max}}{\sum_{j=1}^{p} S_j^2}$$

H_0 : les écarts types sont du même ordre de grandeur
H_1 : le maximum des écarts types est significativement plus grand que les autres.

On compare la valeur de C_{obs} et C_{crit} lue dans la table de Cochran pour un risque α pour un nombre de répétitions (n) et pour (p) opérateur.

Règle de décision

Si $C_{obs} < C_{crit}$: les variances sont de même ordre de grandeur.
Si $C_{obs} > C_{crit}$: la variance maximum est significativement plus grande que les autres.

Cobs=0,584033073

Pour un risque α=5%, n=6 et p=4, Ccrit=0.59

Interprétation

Du fait que Cobs < Ccrit : On accepte l'hypothèse H0.

H0 : les variances sont homogènes, les écarts types observé de même ordre de grandeur

H0 : les variances sont homogènes, les écarts types observé de même ordre de grandeur.

➢ Répétabilité et reproductibilité de la méthode

Test d'ANOVA-1

Pour la vérification de la répétabilité et la reproductibilité de la méthode de référence, on utilise le test de l'ANOVA-1, son objectif principal est de tester l'hypothèse selon laquelle les moyennes de plusieurs groupes indépendants de distributions normales sont égales. Pour chaque source de variation, on détermine le degré de liberté (ddl) après on calcule la somme des carrés des écarts (SCE) et le carré moyen (CM) puis on calcule le coefficient de Fisher (F) et la P-value comme indiquer ci-dessous (tableau: 5)

Source	Ddl	SCE	Variance (CM)	F	P-value
Inter	3	0.023883	0.007961	14.51	3,09
Intra	20	0.010972	0.000549		
Total	23	0.034855			

Tableau 5: Méthode d'ANOVA

Le coefficient de Fisher est égal au Carré moyen (CM) intergroupe sur le carré moyen intragroupe.

- Pour un risque α=5%, P-value = loi.F (0.05, ν1=p-1=3, ν2=n-p=20) sur Excel.

Interprétation

Puisque (P-value=3.09 > α=5%), l'hypothèse d'égalité des moyennes sera acceptée. On conclura que les données sont compatibles (à ce niveau de risque) avec l'hypothèse d'égalité des moyennes.

➢ Limite de répétabilité

Après qu'on a vérifié l'égalité des moyennes via l'ANOVA, on calcule la limite de répétabilité à partir du Carré Moyen intra-laboratoire:

Variance (CM)	Ecart type (Sr)	k (α=95%)	Limite de répétabilité
0,000549	0,0234	2	$r=2\times\sqrt{2}\times Sr=0,06627$

Tableau 6: Variance, Ecart type et la limite de Répétabilité

Interprétation

On constate que la différence absolue entre deux valeurs successives obtenu par même laboratoire, même méthode, même opérateur est inferieur à (r=0,066). On conclue que la méthode est répétable.

➢ Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire est calculée à partir des carrés moyens intra et inter-laboratoire via la relation suivante:

Relation	Variance (S^2L)	Ecart type (SL)
$S^2L = (CM_F - CM_r)/n_i$	S^2L = (0,00796-0,000594)/6 =0,001235	0.03514

Tableau 7: calcul de la Fidélité intermédiaire

➢ Limite de reproductibilité

Après la détermination de l'écart type de répétabilité et l'écart type de la fidélité intermédiaire, on calcule la limite de reproductibilité de la façon suivante:

Variance (S^2R)	**Ecart-type (SR)**	**k (α=95%)**	**Limite de Reproductibilité**
0.001784	SR =0.04223	2	$R=2\times\sqrt{2}\times SR=0.11935$

Tableau 8: calcul de la limite de reproductibilité

Interprétation

Cela signifie que, si on réalise deux mesures par deux opérateurs différents, on peut s'attendre à avoir des résultats qui diffèrent au plus de 0,0133.

On constate que les limites de reproductibilité et de répétabilité calculées sont inferieures à celles indiquées par la norme.

Donc la répétabilité et reproductibilité de la méthode sont vérifiées.

3. Vérification de la justesse

Après avoir prouvé la fidélité de la méthode, on va s'intéresser au test de justesse qui précise qu'on effectue 10 mesures des échantillons inter laboratoire de concentration connue puis on calcule la moyenne et l'écart type.

Les résultats obtenus sont :

	X1	**X2**	**X3**	**X4**	**X5**	**X6**	**X7**	**X8**	**X9**	**X10**	**Moyenne**	**Ecart type**
Abs	**0.095**	**0.098**	**0.095**	**0.096**	**0.0973**	**0.0975**	**0.0982**	**0.0954**	**0.0976**	**0.0959**	**0.09686**	**0,00114329**

Tableau 9 : les mesures des échantillons inter-laboratoires

Après on passe à l'application du test comme suite:

Valeur vraie	Tobs	Tcrit t(0.975,9)	Conclusion
0.0975	Tobs = |0.0975-0.0968|/(0.3112/racine(10)) =0.0071	2.262	La méthode est juste

Tableau 10 : Test de vérification de la justesse

- Pour un risque α=5% et ddl = n-1= 9, tcrit = 2,262 ;

Interprétation

Puisque Tobs < Tcrit : la différence entre la moyenne des mesures et la valeur vraie n'est pas significative donc la méthode est juste.

Conclusion

D’après la validation de la méthode spectrophotométrique, on a constaté qu’elle est fidèle et juste, ce qui prouve que cette méthode correspond à l’usage pour lequel elle est prévue. Avec la mise en place des systèmes d’assurance qualité dans les laboratoires, la validation des méthodes d’analyse est aujourd’hui un objectif important.

C’est pour cette raison, que nous nous sommes intéressés dans ce projet de fin d’étude à la validation du dosage de la rifampicine par spectrophotométrie UV-Visible, ceci dans le but de raccourcir la durée et d’améliorer l’efficacité des traitements de certaines maladies et de réduire leurs coûts. Ce dosage a pour but également de rendre le traitement plus efficace en diminuant la gravité des effets indésirables de ces médicaments et aussi pour une meilleure adaptation de la dose administrée.

Références bibliographiques

[1]: Gallo, G.G and Radialli; (1976). The Merck Index 12:83-82, P Anal. Profiles of drug Subs,K Florey , ed Academic Press NY 5 467.

[2]: Mars 2015. Organisation mondial de la santé « OMS ». Aide-mémoire N°104 Tuberculose. OMS2015.

[3]: P. Sensi, P. Margalith et M. T. Timbal;(1959). « Rifomycin, a New antibiotic : Preliminary Report », Ed Sci vol. 14 p. 146.

[4]: Sylvain Patrice KANGNI Lun 8 juin 115.

[5]: J Antimicrob Chemother; (1992). Mitchison DA. The Garrod Lecture. Understanding the chemotherapy of tuberculosis – current problems 477-93.

[6]: Levin ME; (1992). Hatfull GF. Mycobacterium smegmatis RNA polymerase: DNA-supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. Mol Microbiol 8 277-85.

[7]: **Françoise Van Bambeke, Dr Sc. Pharm. Paul Tulkens, Dr. Méd.** ;(2007-2008). Syllabus national belge de pharmacologie (coord.: Prof. A. Herchuelz [ULB]) ; Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire Université catholique de Louvain page 102.

[8]: **Wehrli W. (**1983). Rifampin : Mechanism of action and resistance. Rev Infect Dis (5).

[9]: **Acocella G.** (1983)Pharmacokinetics and metabolism of rifampin in human. Rev Infect Dis (5)**.**

[10]: **Françoise Van Bambeke, Dr Sc. Pharm. Paul Tulkens, Dr. Méd.** (2007-2008). Syllabus national belge de pharmacologie (coord.: Prof. A. Herchuelz [ULB]) ; Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire Université catholique de Louvain page 104.

[11] : Bethesda MD National Center for Biotechnology Information , **US National Library of Medicine**8600 Rockville Pike, 20894 États-Unis.

[12]: Gruppo Lepetit S.p.A. I - 03012 Anagni. RIFADINE® (AVENTIS) VII E 2.

[13] : Information professionnelle du Compendium Suisse des Médicaments® Rifampicin Labatec®.

[14] : Dr Cédric Arvieux - CHU de Rennes - Université de Rennes 1 - unité SeRAIC.

[15] : Ressources en pharmacologie. Faculté de médecine Pierre et Marie CURIE.

[16] : Max Feinberg; (2010) .Méthodologie d'analyse de risque alimentaire Ŕ INRA: Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude page 14-15.

[17] : PFE CHAHBI Asmae; (2011/2012). Analyse descriptive de la démarche qualité et validation d'une méthode d'analyse dans un laboratoire.