

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
جامعة 20 أوت 1955 - سكيكدة  
UNIVERSITE 20 AOUT 1955-SKIKDA



**Faculté des Sciences**  
**Département des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Mémoire Présenté en Vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Filière: Sciences de la Nature et de la Vie**

**Option: Microbiologie Appliquée**

**Intitulé**

**Analyse quantitative en milieu pharmaceutique d'un produit thérapeutique par deux méthodes différentes (microbiologique et spectrophotométrique).**

**Présenter par: DRIHEM Radja et BOUKBIR Chaima**

**BOUKRYATA Halima et BOUKELOUA Ilham**

**Membredejury:**

<b>Dr. Imène BECHEKER</b>	<b>MCA</b>	<b>Présidente</b>	<b>Univ. de Skikda</b>
<b>Dr. Abdelghani MAHMOUDI</b>	<b>MCA</b>	<b>Directeur de mémoire</b>	<b>Univ. de Skikda</b>
<b>Dr. Imen LAIB</b>	<b>MCA</b>	<b>Examinatrice</b>	<b>Univ. de Skikda</b>

**Année universitaire : 2021/2022**

# **Remerciements**

D'abord, je remercie « Dieu », le Tout puissant qui nous a donné la force, le courage et la patience tout au long de la réalisation de ce modeste travail et pour le mener à terme.

Nous adressons des remerciements particuliers à Dr. Abdelghani MAHMOUDI qui a accepté de nous encadrer et sans lui ce modeste travail n'aurait jamais vu le jour, ainsi pour son soutien et ses encouragements tout au long de ce projet.

Aussi, Nous exprimons évidemment nos sincères remerciements à l'ensemble de membres de jury: Dr. Imène BECHEKER et Dr. Imèn LAIB, pour avoir bien voulu examiner ce travail.

Nos remerciements vont tout d'abord aux membres des laboratoires d'agronomie de l'université 20 Aout 1955, et aux membres du laboratoire de microbiologie en particulière Dr. Leila MAACHIA, pour leurs précieux aide et conseils pratiques.

Nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont participé à notre encadrement et tous ceux qui, de près ou de loin nous ont soutenu pour réaliser ce projet dans les meilleures conditions.

# **Dédicace**

*Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je arriverais à leur exprimer mon amour sincère :*

*A mon cher père "Rachid Boukeloua" :*

*Pour son affection, son soutien et la confiance qu'il m'a accordé.*

*A ma chère mère "Saliha Mekhaba" :*

*Je lui dédie ce succès en reconnaissance de tous les sacrifices qu'elle a fait pour mon succès et je lui souhaite une longue vie et une bonne santé.*

*A mes sœurs : " Zahia et Assia " et à mon cher frère " Omar " :*

*Je leur souhaite une vie pleine de joie et de bonheur.*

*A mes cher amis : " Halima, Chaïma, Nor el houda, Radja, Roumaïssa ".*

*A toutes la famille Boukeloua*

*A tous mes professeurs de l'école primaire à l'université.*

*Ilham*

# Table des matières

Remerciements et dédicaces	
Table des matières	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction général.....	01

## PREMIER PARTIE : ETUDE THEORIQUE

### CHAPITRE I

#### Généralité sur les antibiotiques et les médicaments

I.1 historiques des antibiotiques .....	04
I.2 définition des antibiotiques.....	04
I.3 grandes familles d'antibiotiques.....	05
I.4 mode d'action des antibiotiques.....	05
I.5 origine des antibiotiques.....	05
I.6 Rôle des antibiotiques.....	05
I.7. Les macrolides.....	06
I.7.1. Historique des macrolides.....	06
I.7.2. Définition des macrolides.....	06
I.7.3 Principe pharmacologique active.....	06
I.7.4. Excipients.....	06
I.7.5. Mode d'action.....	06
I.7.6. Classification du macrolide.....	07
I.7.7. Les germes sensible et résistant.....	07
I.8. L'azithromycine.....	08
I.8.1. Historique.....	08
I.8.2. Définition.....	08
I.8.3. Propriété chimiques et propriété physiques.....	08
I.8.4. Formes commercialisée.....	09
I.8.5. Mécanismes d'action.....	09
I.8.6. Antibiorésistance.....	09
I.8.7. Les causes de l'utilisation.....	09
I.9. Généralité sur Les médicaments.....	09
I.9.1. Définition.....	09
I.9.2. Forme des médicaments.....	10
I.9.2.1. Un principe actif.....	10
I.9.2.2. Les excipients.....	10
I.9.2.3. La forme galénique.....	10
I.9.2.4. Catégories de présentation médicamenteuses.....	10
I.9.3. Origine des médicaments.....	10

## CHAPITRE II

### Aperçu sur les méthodes physico-chimiques d'analyse

II.1 Spectrophotométrie UV-Visible.....	13
II.1.1 Historique.....	13
II. 1.2. Définition.....	13
II. 1.3. Domaine spectral.....	13
II. 1.4. Principe de la spectrophotométrie UV-visible.....	13
II. 1.5. Appareillage de la spectrophotométrie UV-visible .....	14
II. 1.5.1 Source lumineuse.....	14
II. 1.5.2 Monochromateur.....	14
II.1.5.3 La cuve.....	14
II.1.5.4. Détecteur.....	14
II. 1.6. La loi de Lambert-beer.....	15
II. 1.6.1. La validation de la loi Beer- Lambert.....	16
II. 1.6.2. Domain d'applications.....	16
II.2. Méthode microbiologique.....	17
II.2.1. Historique.....	17
II.2.2. Définition.....	17
II.2.3. Reproduction bactéries.....	17
II. 2.4. Classification des bactéries.....	18
II. 2.5. Morphologie Bactérienne.....	18
II. 2.6. Nutrition Bactériennes.....	19
II. 2.6.1. Besoins élémentaires et énergétiques.....	20
II. 2. 6.2. Substances spécifiques.....	20
II. 2. 6.3. Facteurs influençant la croissance.....	21
II. 2.7. Croissance bactériennes.....	21
II.2.7.1. Courbe de croissance.....	21
II.2. 7.1.1. Phase de latence.....	21
II.2. 7.1.2. Croissance exponentielle.....	21
II.2. 7.1.3. Phase de ralentissement.....	21
II.2. 7.1.4. Phase maximale stationnaire.....	21
II. 2. 7.1.5. Phase de déclin.....	22
II.2.7.2. Croissance in vitro (milieux liquide et solide.....	22
II.2.7.3. Croisière in vivo.....	22
II.2.8. Bactéries pathogènes pour l'homme.....	23
II.2.9. Les effets des antibiotiques sur les bactéries.....	23
II.2.10. Etude de l'activité antibactérienne.....	23
II.2.11. Technique de mesure (L'antibiogramme).....	24
II.2.11.1. Méthode de dilution.....	24
II.2.11.2. Méthode de diffusion.....	24

## DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

### CHAPITRE III

#### Dosage d'azithromycine par une méthode spectrophotométrique d'UV

III. 1. Introduction.....	28
III. 2. Matériel et méthodes.....	28
III.1. Appareillage.....	28
III. 2.2. Produits chimiques.....	28
III.2.2.1. Etalons.....	28
III. 2.2.2. Produits pharmaceutiques.....	28
III. 2.2.3. Réactifs et solvants organique.....	28
III. 3. Méthode expérimentale.....	29
III.3.1 Préparation des solutions de travail.....	29
III. 3.2. Procédure générale.....	29
III. 3.3. Optimisation conditions de la dérivation chimique.....	29
III. 4. Résultats et discussion.....	30
III. 4.1 Détermination de la longueur d'onde maximale.....	30
III. 4.2 Optimisation de conditions de la dérivation chimique.....	30
III.4.2.1 Influence de la nature du solvant.....	30
III. 4.2.2 Effet de la concentration du réactif NQ.....	31
III. 4.2.3. Influence des volumes de NaOH.....	33
III. 4.2.4 Influence du temps de réaction.....	34
III. 4.2.5 Influence de la température.....	34
III. 4.3. Validation de la méthode d'analyse.....	35
III.4.3.1. Fonction de réponse et linéarité.....	35
III. 4.3.2. Application en milieu pharmaceutique.....	37
III. 5. Conclusion.....	37

### CHAPITRE IV

#### Dosage d'azithromycine par une méthode microbiologique

IV. 1. Introduction.....	39
IV.2. Etude l'activité antibactérienne.....	39
IV. 3. Objectif d'étude.....	39
IV. 4. Principe de la méthode microbiologique.....	39
IV. 5. Matériel.....	39
IV. 6. Méthode expérimentale.....	40
IV.6.1.Préparation de solutions de travail.....	40
IV. 6.2. Action.....	41
IV. 7. Résultats et discussion.....	42
IV.7.1. Linéarité.....	42
IV. 7.2. Application en milieu pharmaceutique.....	43
IV. 8. Conclusion et comparaison des méthodes.....	44

Conclusion Générale.....46

**Référence bibliographique**

**Annexe**

**Résumé**

# *Liste des abréviations*

**ATB** : Antibiotique.

**FQ** : Fluoroquinolones.

**MO** : Microorganisme.

**API** : Ingrédient pharmaceutique actif.

**CMI** : Concentration minimal inhibitrice.

**LCR** : liquide céphalorachidien.

**AZI** : Azithromycine.

**OMS** : Organisation mondiale de la santé.

**UV** : Ultraviolet.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**ARN** : Acide ribonucléique.

**ATP** : Adénosine triphosphate.

**TG** : Temps de génération.

**CMB** : Concentration minimal bactéricide.

**NaOH** : hydroxyde de sodium.

**NQ** : Naphtoquinone.

**PA** : principe actif.

**Abs** : absorbance.

**min** : minute.

**°C** : Degré Celsius.

# *Liste des figures*

<b>Figure I. 1</b> : Schéma structure chimique d'AZI.....	08
<b>Figure II. 1</b> : Schéma domaines d'absorption de l'UV-Visible.....	13
<b>Figure II. 2</b> : Schéma du principe de spectrophotométrie UV-Visible.....	14
<b>Figure II. 3</b> : Reproduction cellulaire des Bactéries.....	18
<b>Figure II. 4</b> : La morphologie Bactérienne.....	19
<b>Figure II. 5</b> : Courbe de croissance Bactérienne.....	22
<b>Figure III.1</b> : Spectre d'absorption en UV du complexe AZI-NQ .....	30
<b>Figure III.2</b> : Influence de la nature du solvant sur l'absorbance d'AZI-NQ.....	31
<b>Figure III.3</b> : Effet de la concentration de NQ sur l'absorbance d'AZI-NQ.....	32
<b>Figure III.4</b> : Influence des volumes de NaOH sur l'absorbance des complexes PA-NQ....	33
<b>Figure III.5</b> : Influence du temps de réaction sur l'absorbance des complexes AZI-NQ.....	34
<b>Figure III.6</b> : Influence de température sur l'absorbance des complexes AZI-NQ.....	35
<b>Figure III.7</b> : Courbe d'étalonnage du détecteur en milieu aqueux (AZI).....	36
<b>Figure IV.1</b> : Courbe d'étalonnage de la méthode microbiologique.....	43

# *Liste des tableaux*

<b>Tableau I.1 :</b> Propriétés chimique et structure physique d'AZI.....	08
<b>Tableau II.1 :</b> Temps de génération en Vitro et en Vivo de quelques bactéries.....	22
<b>Tableau III.1 :</b> Influence de la nature du solvant sur l'absorbance du complexe AZI-NQ....	31
<b>Tableau III.2 :</b> Effet de la concentration de NQ sur l'absorbance d'AZI-NQ.....	32
<b>Tableau III.3 :</b> Influence des volumes de NaOH sur l'absorbance des complexes AZI-NQ..	33
<b>Tableau III.4 :</b> Influence du temps de réaction sur l'absorbance du complexe AZI-NQ.....	34
<b>Tableau III.5 :</b> Influence de la température sur l'absorbance du complexe PA-NQ.....	35
<b>Tableau III.6 :</b> Linéarité : changement de variables de PA-NQ en milieu aqueux.....	36
<b>Tableau III.7 :</b> Résultats statistique de l'étude de la linéarité d'Azithromycine par la méthode spectrophotométrie UV.....	36
<b>Tableau III.8 :</b> Résultats de dosage d'azithromycine(PA) en milieu pharmaceutique (ZOTRIX® 500 mg, comprimé), par la méthode spectrophotométrie.....	37
<b>Tableau IV.1 :</b> Résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm.....	42
<b>Tableau. IV.2 :</b> Résultats statistique de l'étude de la linéarité d'Azithromycine par la méthode microbiologique .....	43
<b>Tableau IV.3 :</b> Résultats de dosage d'azithromycine (PA) en milieu pharmaceutique (ZOTRIX® 500 mg, comprimé), par la méthode microbiologique.....	43



***Introduction  
Générale***

# ***Introduction Générale***

Le corps humain contient un grand nombre de bactéries, dont certaines sont bénéfiques et ne causent aucune maladie, mais aident plutôt le corps dans certaines fonctions telle que l'analyse des aliments. Certaines d'entre elles sont nocifs et affligent les humains de maladies et l'infection bactérienne, qui entraîne parfois la mort, surtout chez les enfants pendant les premières années de leur vie. Parmi les germes responsables de cette dangereuse infection figurent la *Salmonella*, *Bacillus Subtilis*...etc. Lorsque cette infection est provoquée par la transmission de bactéries à une personne et que cette transmission peut provenir d'une personne infectée ou d'un milieu environnemental, ou en mangeant des aliments ou des boissons contaminés par des bactéries. L'infection bactérienne se propage rapidement et ses effets varient d'un individu à l'autre selon la résistance et l'immunité de chacun.

Pour traiter cette infection, les médecins prescrivent des antibiotiques, qui sont l'un des groupes de médicaments utilisée pour éliminer les bactéries, qui agissent soit en les éliminant directement, en arrêtant leur croissance, soit leur affaiblissement afin que le système immunitaire de l'organisme les surmonte. L'anti biothérapie clinique dépend généralement de la bactérie responsable de l'antibiotique. En revanche, les macrolides restent le premier choix dans le traitement des infections bactériennes dont l'azithromycine est le plus approprié.

La qualité du médicament affecte l'efficacité et la sécurité du traitement, et pour confirmer cette qualité, il existe plusieurs méthodes d'analyse. Dans cette étude, nous avons appliqué deux techniques différents: méthode analyse spectroscopique en UV et méthode analyse microbiologique pour le dose d'AZI en milieu pharmaceutique, afin s'assurer le respect des normes spécifiques de la pharmacopée et des documents fournis par les fabricants, reconnus par les autorités compétents.

Dans la partie première de ce mémoire de Master en microbiologie appliquée, nous avons présenté des généralités sur les antibiotiques de macrolides, leur classification leurs modes d'action ...etc. ensuite nous avons abordé brièvement un aperçu sur les techniques d'analyse ; spectroscopiques et microbiologiques utilisés. La partie deuxième partie de travail est consacrée à la méthodologie suivie, les résultats obtenus et leur interprétation et discussions.

*PREMIERE PARTIE*

**ETUDE THEORIQUE**



## ***CHAPITRE 1***

### ***Généralité sur les antibiotiques et les médicaments***

## I. Généralité sur les antibiotiques et les médicaments

### 1. Historique des antibiotiques

Le mécanisme antibiotique a été découvert fortuitement par Alexander Fleming en 1928: sa culture de bactéries avait été bloquée par la contamination d'un champignon, la pénicilline. Mais la production industrielle de la pénicilline ne débutera pas avant 1942.

La découverte des antibiotiques a été une découverte médicale majeure qui a permis de sauver des millions de vie en traitant des infections jusque là incurables : tuberculose, pneumonie, septicémie...etc. Ses bénéfices sont aujourd'hui menacés par le développement de résistances aux antibiotiques. Les antibiotiques ne sont pas efficaces contre d'autres microbes comme les virus ou les champignons. Les antibiotiques existent sous forme médicaments à prise orale (comprimés, gélules, sachets, sirops), de pommade ou d'injections intramusculaire ou intraveineuse. [1]

### 2. Définition des antibiotiques

Un antibiotique (du grec anti : « contre », et bios : « la vie ») est une substance naturelle ou synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries. Dans le premier cas, on parle d'antibiotique bactéricide et dans le second cas d'antibiotique bactériostatique. Lorsque la substance est utilisée de manière externe pour tuer la bactérie par contact, on ne parle pas d'antibiotique mais d'antiseptique. [2]

### 3. Grandes familles d'antibiotiques

**Les betalactamines :** elles comprennent :

- Les pénicillines G. ex : PENICILLINE G, ORACILINE.
- Les pénicillines M. ex : BRISTOPEN, ORBENINE.
- Les aninopénicillines ex : TOTAPEN, PENGLOBE, CLAMOXYL.
- Les carboxypénicillines ex : TICARPEN c.
- Les aciluréidopénicillines ex : BAYEN, PIPERILLINE.
- Les carbapénèmes ex : TIENAM.
- Les monobactams ex : AZACTAM – Les céphalosporines :
  - De 1<sup>ère</sup> génération ex : CEFACIDAL, KEFORAL.
  - De 2<sup>ème</sup> génération ex : APACEF, KEFANDOL.
  - De 3<sup>ème</sup> génération ex : CEFOBIS, CLAFORAN, ROCEPHINE.
  - De 4<sup>ème</sup> génération ex : CEFROM.

**Les Macrolides :**

- Vrais ex : ERYTHROCINE, JOEACINE, ROVAMYCINE.
- Apparentés :
  - Lincosanides ex : LINCOCINE, DALACINE.
  - Synergistines ex : PYOSTACINE, STAPHYLOMYCINE.

**Les Aminosides :** Ex : AMIKLIN, GENTALLINE, NEBCINE.

**Les Sulfamides :** Ex : ADIAZINE, BACTRIM.

**Chloramphénicol :** Ex : TIFOMYCINE.

**Les Imidazoles :** Ex : FLAGYL, TIBERAL.

**Les polymyxines :** Ex : COLIMYCINE.

**Les Tétracycline :** Ex : VIBRAMYCINE, VIBRAVEINEUSE.

**Les Glycopeptides :** Ex : TARGOCID, VANCOCINE, VANCOMYCINE.

**Les Quinolones :** Ex : CIFLOX, NOROXINE, OFLOCET, PEFLACINE.

**Antibiotique Divers :**

- Acide fusidique ex : FUCIDINE.
- Rifamycine ex : RIFOCINE.
- Fosfomycine ex : FOSFOCINE.
- Inhibiteurs des betalactamines ex : BETAMAZE. [3]

#### **4. Mode d'action des antibiotiques**

- Les ATB agissent à des niveaux précis de la structure bactérienne.
- Les principales cibles sont :
  - La paroi bactérienne par inhibition de sa synthèse (Vancomycine, Fosfomycine, pénicillines)
  - Membrane cytoplasmique (polymyxines)
  - ARN des ribosomes : inhibition de la synthèse des protéines (Macrolides, tétracyclines, chloramphénicol, aminosides)
  - ADN bactérien : inhibition de sa synthèse (quinolones et FQ)
- Les différentes indications :
  - But curatif : traitement d'une infection.
  - But prophylactique : en prévention d'une infection
- Les voies principales d'élimination :
  - Urinaire : reins
  - Biliaire : foie. [4]

#### **5. Origine des antibiotiques**

Les ATB utilisés en médecine sont fabriqués à partir de cultures de MO ou sont des médicaments entièrement synthétisés. Le premier d'entre eux (la pénicilline) a été découvert par Alexander Fleming, par hasard, chez le champignon *penicillium glaucum*.

Un antibiotique est une substance qui a la capacité de réduire ou d'interrompre la multiplication des bactéries. Ce médicament est un composé chimique, élaboré sur la base d'un MO ou à partir de produits de synthèse. [5]

#### **6. Rôle des antibiotiques**

Les antibiotiques sont utilisés en médecine (et en médecine vétérinaire) pour lutter contre des infections bactériennes et doivent être choisis en fonction de leur efficacité sur la bactérie à combattre, ce qui peut être testé grâce à un antibiogramme. [5]

## 7. Les macrolides

### 7.1. Historique des macrolides

1952 : Érythromycine : Première molécule isolée.

1956 : Détermination de sa structure par la chimiste américain Koert Gerzon.

1972 : Découvert de la rapamycine par Surendra N. Sehgal.

1978 : Détermination de Sa structure de la rapamycine.

1980 : Synthèse du premier azalide L'Azithromycine.

1984 : Découvert du tacrolimus. [6]

Kétolides : Macrolides de dernière génération.

### 7.2. Définition des macrolides

Les macrolides sont des molécules à propriétés antibiotiques bactériostatiques. Elles constituent une famille d'antibiotiques capables de diffuser dans les tissus de l'organisme et à l'intérieur des cellules. Les macrolides sont donc actifs sur les germes intracellulaires.

Les macrolides se présentent sous forme de comprimés, de sirops, de suspensions buvables et de flacons injectables en perfusion par voie veineuse.

### 7.2 Principe pharmaceutique active

principe pharmaceutique actif ou l'ingrédient pharmaceutique actif ou ce qui est connu acronyme(API) est la substance de base qui se trouve dans la préparation médicinal et provoque le effet nécessaire, et donne à la préparation médicinal son efficacité pharmacologique .la substance concerné par l'atteinte de la cible ,c'est -à-dire le récepteur ou le canal .ou d'autres pour donner son effet ,par exemple , le médicament Bnadrely utilisé pour les allergies ,la substances Diphenhydramine est le médicament actif concerné par l'accès et l'inhibition de l'histamine -1 récepteurs pour donner la dépendance nécessaire pour se débraser des symptômes d'allergie tel que les démangeaisons, les éruptions cutanées et les rougeurs.

### 7.3. Excipients

Ils sont toutes les substances ajoutées à un dosage de médicament avec la substance active(API) ,qui ont été ajoutées soit pour aider à améliorer la stabilité et la biodisponibilité d'un médicament pendant le stockage et l'utilisation ,soit pour déterminer le dosage approprié et le produit final.

### 7.4. Mode d'action

Les macrolides agissent au niveau de la synthèse protéique de la bactérie, en empêchant la synthèse protéique, par fixation sur la sous unité 50S des ribosomes bactériens. La réplication, la duplication et donc la division cellulaire bactérienne sont ainsi stoppées (c'est la bactériostase). [7]

*La bactériostase :*

Il est le ralentissement de la croissance bactérienne, pouvant aller jusqu'à l'arrêt de cette croissance ; lorsque cette bactériostase est maximale, le nombre des bactéries reste constant. Les défenses naturelles de l'organisme(ou un autre antibiotique en cas d'association) pouvant alors intervenir plus facilement pour éliminer le foyer infectieux.

Pour qu'un antibiotique soit efficace, il faut qu'il arrive en quantité suffisante sur le lieu de l'infection afin d'atteindre la CMI (qui est la concentration minimale inhibitrice capable d'inhiber toute culture de bactéries) et que le germe soit sensible à cet antibiotique. La diffusion de l'antibiotique dans l'organisme est un paramètre important à connaître lors de la prescription.

*La diffusion des macrolides :*

Les macrolides se distribuent de façon large dans l'organisme, sauf dans le LCR (liquide céphalorachidien), le cerveau et les urines.

*Élimination des macrolides :*

Il est essentiellement biliaire, après métabolisation par le cytochrome P450 au niveau du foie, d'où l'existence d'interférences médicamenteuses avec les macrolides.

### 7.5. Classification du macrolide

La première molécule de la classe est l'érythromycine isolée en 1952, en totale neuf molécules ont été mise sur le marché dont huit sont encore disponibles, toutes ces molécules présentent des caractéristiques similaires et quelques particularités, ils possèdent un noyau lactone centrale auquel sont liés des sucres ; au moins 2 sucres: aminés ou neutres.

- ❖ Le noyau lactone est à la base de leur classification : possédant selon la molécule 14 à 16 chaînons. [6]
- ❖ Il existe plusieurs types de macrolides avec 14, 15 ou 16 atomes dans leur macrocycle. On les classe parfois en diverses générations :

**1<sup>er</sup> génération :**

- cycle à 14 atomes de carbone: érythromycine A
- cycle à 16 atomes de carbone: spiromycine

**2<sup>ème</sup> génération:**

- cycle à 14 atomes de carbone : clarithromycine, roxithromycin
- cycle à 15 atomes de carbone : azithromycine
- cycle à 16 atomes de carbone : midécamycine, josamycine.

**3<sup>ème</sup> génération (Kétolides) :**

- cycle à 14 atomes de carbone : télithromycine

Emploie également la spiromycine (utilisée pour traiter la toxoplasmose), l'ansamycine, l'oléandomycine, la carbomycine et le thylacine.

### 7.6. Les germes sensible et résistant

- **Le sont des antibiotiques à spectre moyen, ils sont actifs principalement sur les Gram+ :** les staphylocoques, les streptocoques A, les pneumocoques, les méningocoques, entérocoques, bacille diphtérie et listéria.
- Les macrolides sont actifs également sur quelques Gram: neisseria, hémophiles influenza, Hélicobacter pilori, compylobacter, légionella pneumophlla, chlamydiae
- **Mycoplasma et plusieurs Atypiques :** ricketssia borrelia, mycobactéries.
- Résistances entérobactéries les sur d'activité pas n'ont macrolides les : les germes Gram-, car leur membrane externe et imperméable aux macrolides. [8]

## 8. L'azithromycine

### 8.1. Historique

L'azithromycine a été découverte en 1980 par une équipe de chercheurs croates. : Gabrijela Kobrehel, Gorjana Radobolja-Lazarevski et Zrinka Tamburasev dirigés par le Dr Slobodan Dokic. Elle a été brevetée en 1981. [9]

### 8.2. Définition

Le nom de l'azithromycine est dérivé du substituant azane et de érythromycine.

L'azithromycine est le premier antibiotique macrolide du groupe azalides. L'azithromycine est dérivée de l'érythromycine par addition d'un atome d'azote dans le cycle lactone de l'érythromycine A, rendant ainsi cet anneau à 15 atomes. L'azithromycine est utilisée pour le traitement des infections des voies respirations, de celles des tissus mous et des infections génito-urinaires.

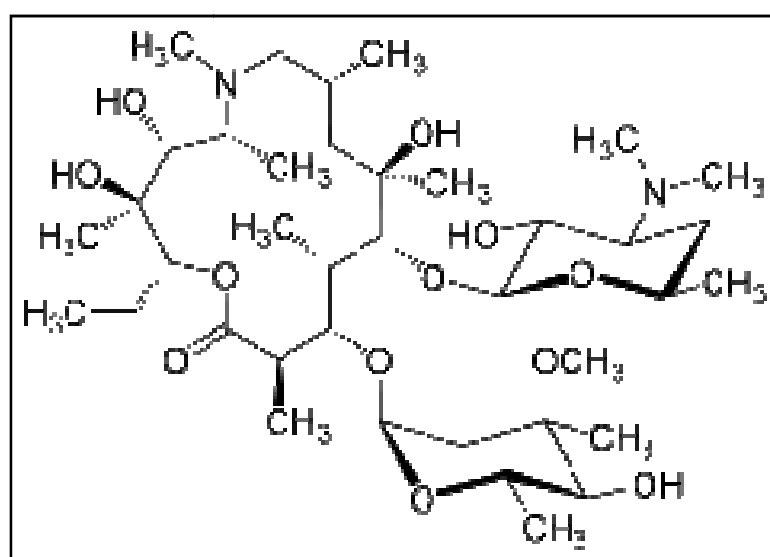


Figure I.1 Structure chimique de l'azithromycine

### 8.3. Propriétés chimique et propriétés physique

Les propriétés chimique et propriétés physique de l'azithromycine sont regroupées dans le tableau suivant. [6]

Tableau I.1 Propriétés chimique et propriété physique d'AZI

Propriété chimique	Formule	C 38 H72 N 2 O12 [Iso mères]
	Masse molaire	748,98 5 ±0.0394 g/mol
	pKa	8.74 à 25 °c
Propriété physique	T° fusion	113 à 115 °c
	solubilité	Peu sol. Dans l'eau

#### 8.4. Formes commercialisée

- L'azithromycine est en général administrée sous forme de comprimés ou de suspensions orales. Elle est également disponible sous forme d'injection intraveineuse et plus récemment sous forme de collyre. La molécule est commercialisée sous le nom de Zithromax® par le laboratoire Pfizer et sous le nom d'Azyter par le laboratoire Théa pour la forme collyre.
- Gélules de comprimés de 250 mg et 500 ml.
- Poudre pour suspension buvable ,200ml /5ml, pour solution, dans une l'eau filtrée. [10]

#### 8.5. Mécanismes d'action

L'azithromycine agit sur les infections bactériennes en inhibant la synthèse des protéines bactériennes. Cette inhibition se produit après fixation à la sous-unité 50S des ribosomes des bactéries étant sensibles à l'azithromycine. [6]

#### 8.6. Antibiorésistance

- L'azithromycine utilise contre des infections à gonocoque (MST qui devient résistants à d'autres antibiotiques),
- et est avéré contre certaines souches de Streptococcique (infection streptococcique du groupe A (GAS) causer par streptococcies Pyogènes.
- L'azithromycine étant alternatif donnée aux patients allergique au sensible à la Pénicilline
- Des souches streptococcique de GAS, sont (ou sont devenues) résistantes aux macrolides, dont à l'azithromycine. [11, 12]

#### 8.7. Les causes de l'utilisation

- Trachome, conjonctivite causée par Chlamydia trachomatis.
- Cervicite et urétrite causées par Chlamydia trachomatis (en association avec le traitement de la gonorrhée), granulomatose inguinale (donovaniose) , plaies molles, syphilis précoce.
- Choléra (si la souche sensible au médicament), fièvre typhoïde, pain leptospirose.
- Coqueluche, diphtérie, pneumonie causée par Mycoplasma pneumoniae et Chlamydia pneumoniae.
- Traitement de deuxième intention de la shigellose.
- Amygdalite Streptococcique, otite moyenne aigue, uniquement chez les patients allergiques aux pénicillines.

### 9. Généralité sur Les médicaments

#### 9.1. Définition

Selon la définition du dictionnaire pharmaceutique de l'OMS un médicament est «toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer , corriger ou modifier leurs fonction organiques».

Le médicament est défini par la loi Algérienne relative à la protection et à la promotion de la santé dans l'article 170 de la loi n°85-05 du 16 février 1985 comme étant :«Toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curative ou préventive à l'égard des maladies humaines ou animales ou toute substance ou composition pouvant être utilisé chez l'homme ou pouvant lui être administrée en vue soit de restaurer, de corriger ou de

modifier des fonctions physiologique en exerçant action pharmacologique, immunologique ou métabolique, soit d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger, modifier leurs fonctions organiques». [13]

## 9.2. Forme des médicaments

Un médicament est constitué généralement de deux parties et une forme :

**9.2.1. Un principe actif :** qui est l'élément porteur de la capacité de traitement ou de prévention recherchée. «Le principe actif est une substance d'origine chimique ou d'origine naturelle, caractérisée par un mécanisme d'action précis dans l'organisme». Exemple : le paracétamol.

**9.2.2. Les excipients :** ceux-ci sont également des substances d'origine chimique ou naturelle mais qui, individuellement, ne présentent pas d'effet curatif ou préventif. Ces éléments sont inertes mais néanmoins essentiels, car ils rendent possible l'utilisation du médicament. L'ensemble du principe actif et des excipients constitue la forme galénique ou appelée encore pharmaceutique, c'est-à-dire le médicament dans sa forme destinée à être administrée à l'homme, comme par exemple le comprimé pour une administration par voie orale ou le soluté injectable pour une administration par voie parentérale.

**9.2.3. La forme galénique :** c'est une forme pharmaceutique est présentée accompagnée d'un conditionnement particulier. On parle de conditionnement secondaire, c'est-à-dire l'emballage final délivré à la personne qui va utiliser le médicament.

**9.2.4. Catégories de présentation médicamenteuses :** on distingue plusieurs de forme galénique :

- ✓ Forme liquide
- ✓ Forme solide
- ✓ Forme prête à l'emploi
- ✓ Forme à reconstituer
- ✓ Forme unidose
- ✓ Forme multidose. [14]

## 9.3. Origine des médicaments

### ➤ Origine végétale :

La phytothérapie est très ancienne et connaît actuellement un regain d'intérêt auprès du public soucieux de traitement naturel. Il est possible d'utiliser les plantes entières ou les produits d'extraction qu'elles fournissent.

### ➤ Origine animale :

Leur emploi est aussi ancien que celui des plantes, on utilise actuellement en thérapeutique des organes, glandes ou tissus humains ou animaux (sang et plasma humain) et des principes actifs obtenus par extraction (des hormones et des enzymes).

➤ **Origine minérale :**

Certains minéraux qu'ils soient des produits naturels et purifiés ou obtenus par des réactions de chimie minérale sont employés en qualité de principe actif ou d'excipients de médicaments (eau, talc, .....). [14]

➤ **Origine microbiologique :**

C'est le cas des vaccins obtenus à partir des bactéries ou de virus atténués ou tués, et les antibiotiques découverts fondamentalement dans le traitement des maladies infectieuses.

➤ **Origine synthétique :**

La synthèse de molécules complexe nécessite souvent d'importantes études de recherche et de mise au point par étapes successives pour aboutir à la structure désirée. Il est possible dans certains cas de partir de molécule déjà connue, d'origine naturelle ou synthétique, les transformer pour aboutir à de nouvelles molécules.

➤ **Origine biotechnologique :**

Elle s'agit de méthodes de synthèse très élaborées faisant intervenir pour l'essentiel des techniques de génétique. [15]



## ***CHAPITRE 11***

***Aperçu sur les méthodes  
physico-chimique d'analyse***

## II. Aperçu sur les méthodes physico-chimiques d'analyse

### 1. Spectrophotométrie UV-Visible

#### 1.1. Historique

Le spectrophotomètre a été inventé en 1940 par Arnold J. Beckman et ses collègues des laboratoires nationaux. En 1941, le modèle DU a été réalisé avec une lampe à hydrogène et autre amélioration cette conception est demeurée essentiellement inchangée de 1941 à 1976, le spectrophotomètre du de Beckman été qualifié de «FORDT». En 1984, Cecil instruments a produit un spectrophotomètre qui a été contrôlé par microprocesseur ce dispositif automatisé amélioré la vitesse. De 1984 à 1985, le développement a été fait dans les versions à double faisceau avec les années 1990 vint l'ajout d'un logiciel externe qui a permis à l'écran des spectres.

#### 1.2. Définition

La spectrophotométrie est le domaine qui étudie la mesure de l'énergie transportée par les rayonnements électromagnétique dans le domaine de la lumière visible. La spectrophotométrie UV-visible est une technique analytique fondée sur l'étude du changement de la lumière traversant une solution colorée, dans un domaine d'application comprise entre 200 et 800 nm, en effet pour pouvoir déterminer les concentrations des substances absorbantes. [16]

#### 1.3. Domaine spectral

Absorption dans l'ultraviolet et le visible repose sur l'absorption du rayonnement par les molécules dans le domaine allant de (190 à 800 nm), ce qui correspond à l'ultraviolet (190-400 nm) et au visible (400-800 nm). Certains spectrophotomètres couvrent aussi le proche infrarouge jusqu'à 2 500 nm par exemple.

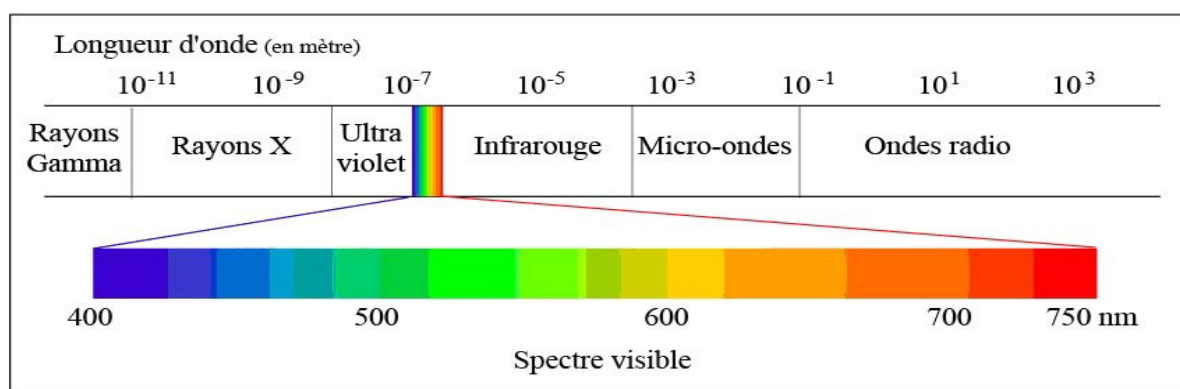


Figure. II.1: Schéma Domaines d'absorption de l'UV-Visible.

#### 1.4. Principe de la spectrophotométrie UV-visible

L'UV-visible s'applique à des produits contenant un groupement chromophore, surtout les molécules contenant au moins noyau aromatique ou un radical, aussi sur les composés hétérocyclique. Lorsqu'un faisceau de radiation monochromatique parallèle traverse sous incidence normale un milieu absorbant homogène et constitué d'une solution de N composés dissous ne réagissent pas les uns sur les autres, l'absorbance de l'ensemble est égale à la somme des absorbances spécifiques. Lors de ce processus, la

molécule passe de l'état fondamentale à l'état excité. La spectrophotométrie UV-visible s'occupe des électrons de valence, les transitions possibles seront les électrons des orbitales moléculaires liante ou non liante et orbitale moléculaire anti-liante. [17]

### 1.5. Appareillage de la spectrophotométrie UV-visible :

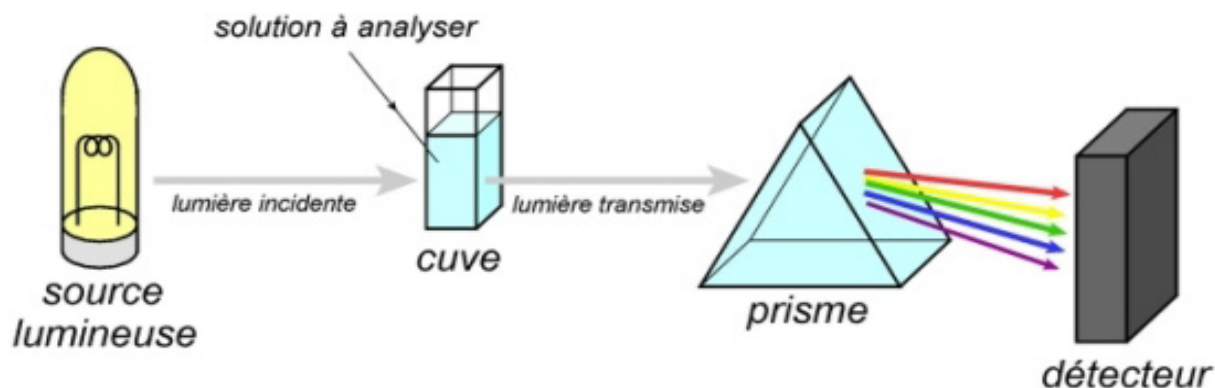


Figure. II. 2: Schéma du principe de spectrophotométrie UV- Visible.

La spectrophotométrie UV-visible comprend quatre parties essentielles:

#### 1.5.1 Source lumineuse

Elle est toujours constituée par soit :

- **Une lampe à décharge au deutérium** : Utilisée dans le domaine de l'UV-visible allant de 190 à 400 nm.
- **Une lampe à filament tungstène** : Pour la région allant de 350 à 800 nm.
- **Une lampe à décharge xénon** : Utilisée dans le domaine UV et visible. Ce type de lampe est très énergétique. Sous forme de flash.

#### 1.5.2 Monochromateur

Système qui permet d'extraire de la lumière émise par la source, un domaine étroit de son spectre d'émission et de sélectionner les longueurs d'onde du spectre. Il est constitué d'une fente d'entrée, d'un système de dispersion et d'une fente de sortie.[18]

#### 1.5.3 La cuve

Elle contient soit l'échantillon soit la référence. La longueur de la cuve est définie allant de 1 à 5 cm, elle doit être transparente aux radiations d'étude. Par exemple en UV en quartz, elles ne peuvent être ni en verre ni en plastique. [19]

#### 1.5.4. Détecteur

Il peut être :

**❖ Une photodiode (semi conducteur) :**

Lorsqu'un photon rencontre un semi-conducteur, il peut transférer un électron de la bande de valence (niveau énergétique bas) vers la bande de conduction (niveau énergétique haut) en créant un pair électron - trou.

**❖ Barrette de diode :**

L'emploi d'une barrette

De diodes permet une mesure simultanée sur toute l'étendue du spectre. Une barrette CCD est un alignement de photodiodes de petites dimensions ( $14\mu\text{m} \times 14 \mu\text{m}$ ) qui fonctionnent en intégrateur de lumière.

**❖ Un photomultiplicateur :**

Une radiation incidente arrache un électron de la cathode par effet photoélectrique.

Cet électron est alors accéléré vers une seconde électrode appelée dynode portée à un potentiel supérieur. L'énergie de l'électron incident est suffisante pour arracher plusieurs autres électrons et ainsi de suite, d'où l'effet multiplicatif.

**1.6. La loi de Lambert-béer :**

Les applications analytiques de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-Visible concernent les molécules en solution. Peuvent être qualitatives et/ou quantitatives. On appelle la loi de Bèer-Lambert.

La loi de Bèer-Lambert établit la relation entre intensité transmise  $I$  et intensité incidente  $I_0$ .

$$I = I_0 \times \text{Exp} (- KIC).$$

Avec:

$I$  : l'intensité du faisceau émergent

$I_0$  : l'intensité du faisceau incident.

$K$  : coefficient d'absorption molaire (c'est une constante de proportionnalité de la substance absorbante qui dépend de la longueur de l'indice).

$C$  : concentration de la substance à analyser (mol/l).

$l$  : l'épaisseur traversée (cm).

La relation fondamentale utilisée en spectrophotométrie est présentée sous la forme :

$$A = \log I/I_0 = \epsilon C l \text{ (ou } \epsilon = K/2.303).$$

Avec :

$A$ : l'absorbance ou la densité optique.

$\epsilon$ : coefficient d'absorbance.

Cette relation est utilisée pour réaliser des dosages ou des suivis cinétiques.

### 1.6.1. La validation de la loi B er- Lambert

Cette relation de proportionnalité n'est confirmée que dans certaines conditions

$$A = \log I/I_0 = \epsilon C l$$

Parmi cette condition :

-La lumière doit être monochromatique.

-Elle est valable que pour la solution limpide.

-La substance à analyser ne doit pas donner lieu à des réactions chimiques sous l'effet du rayonnement incident.

-La substance à analys e ne doit pas donner lieu à des associations variables avec le solvant.  
[20]

### 1.6.2. Domain d'applications :

La spectrophotométrie UV-visible est une méthode facile à mettre en œuvre. Elle est utilisée aussi bien pour l'analyse qualitative que quantitative.

#### a) Analyse qualitative (identification des substances)

La méthode détecte les groupements fonctionnels chromophores mais ne permet pas l'identification certaine des molécules. Elle doit toujours être complétée par d'autre méthode spectrale (IR, RMN, spectrométrie de masse) ou chimiques.

#### b) Analyse quantitative

Les mesures en UV/Visible reposent sur la loi de Beer et Lambert ; qui relie dans certaines Conditions, l'absorption de la lumière à la concentration d'un composé en solution.

## 2. Méthode microbiologique

### 2.1. Historique

**1676** : Anthony van levinhok a découvert la présence de "bactéries " pour la première fois, en utilisant un microscope monochrome de sa propre conception. Van levinhok la appelé "animaux microscopiques ".

**1828** : Le nom de "bactéries " a été lancé sur "des animaux microscopique " par Christian Gottfried ernberg plus tard.

**1859** : Louis pasteur a démontré que le processus de fermentation s'est produit en raison de la croissance des microorganismes. Et que cette croissance n'est pas due à l'auto-réduction.

**1876** : premier à découvrir la relation des bactéries avec maladies le scientifique al-Lemond Robert koukh, qui a fondé les bactéries.

### 2.2. Définition

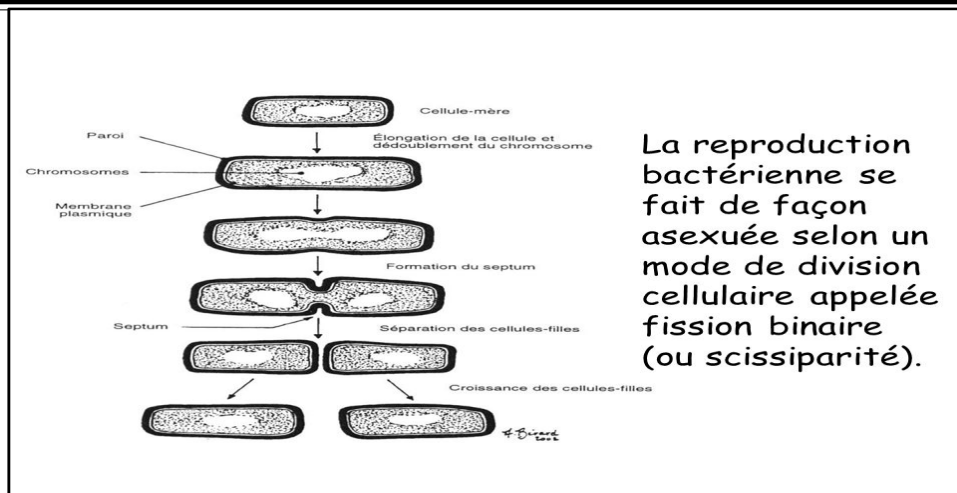
Le Mot bactérie est le pluriel du mot bactérie dans le nouveau latin, et il a été traduit dans la langue grecque du mot grec (βακτήριον) signifie "tige ou bâton" Parce que les premiers types de bactéries découverts étaient sous forme de bâton. C'est un terme générique qui désigne des micro-organismes vivants microscopiques (qui ne sont visibles qu'avec un microscope) présents dans tous les milieux. [21,22]

Les bactéries sont la plupart du temps unicellulaire et sont toujours procaryote .font partie de ce que l'on appelle les germes, ou encore les microbes, de même que les virus ou les parasites.il sont capables de se reproduire seuls grâce à la division cellulaire, à l'inverse des virus. Elles peuvent survivre dans des conditions extrêmes et se retrouve dans l'eau, l'air ou le sol.

### 2.3. Reproduction bactéries

La plupart des bactéries se reproduisent par fission binaire. Dans ce processus, la bactérie, qui est une seule cellule, se divise en deux cellules filles identiques. La fission binaire commence lorsque l'ADN de la bactérie se divise en deux (répliques). La cellule bactérienne s'allonge et se divise ensuite en deux cellules filles avec ADN identique à la cellule parentale. Chaque cellule fille est un clone de la cellule mère.

Lorsque les conditions sont favorables, comme la bonne température et les nutriments sont disponibles, certaines bactéries comme Escherichia coli peuvent diviser toutes les 20 minutes. Cela signifie qu'en sept heures seulement, une bactérie peut générer 2097152 bactéries. Après une heure de plus, le nombre de bactéries aura atteint un colossal 16777216. C'est pourquoi nous pouvons rapidement devenir malades lorsque les microbes pathogènes envahissent notre.



**Figure II.3 :** Reproduction cellulaire des bactéries.

#### 2.4. Classification des bactéries

Il existe des millions de différents types de bactéries dans le monde. C'est pourquoi il est important de se doter d'un système permettant de les répertorier. Les scientifiques classent généralement les bactéries en fonction de deux caractéristiques : [23]

1. L'épaisseur de leur paroi cellulaire;
2. Leur forme.

Critères de classification des bactéries :

- Morphologie microscopique : Cocci (coques), bacilles (bâtonnets) , diplocoques (groupés en deux), en chaînette, en amas... ;
- Morphologie macroscopique : taille – forme – couleur des colonies sur culture ;
- Résultat de la coloration de Gram : Gram positif ou Gram négatif ;
- Température de croissance ;
- Besoins respiratoires : aérobic, anaérobic strict, aéro-anaérobic facultatif, micro aérophile ;
- Mobilité ;
- Présence de spores ;
- Besoins nutritionnels : nécessité de substances particulières.

#### 2.5. Morphologie Bactérienne

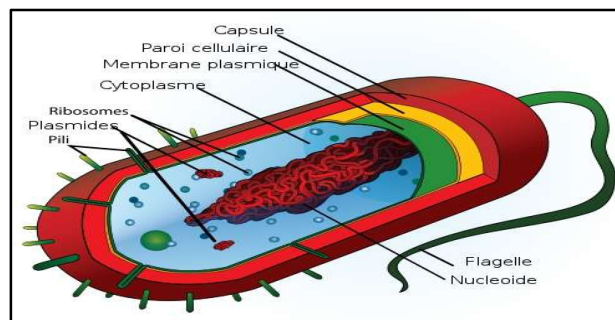
Les bactéries mesurent entre 0,5 et 10-15  $\mu\text{m}$ . Ce sont des organismes procaryotes qui ne possèdent pas de noyau, mais un ADN chromosomique circulaire situé dans le cytoplasme. De nombreuses bactéries contiennent une autre structure d'ADN extra-chromosomique, appelée plasmide. Elles sont entourées d'une paroi complexe et possèdent souvent des flagelles.

Il se compose généralement de :

- Pili – structures semblables à des cheveux qui aident la bactérie à se fixer à des surfaces et à d'autres bactéries.
- Plasmides – matériel génétique (molécules d'ADN).

- Ribosomes – structures qui fabriquent des protéines.
- Cytoplasme – matière vivante semblable à un gel dans laquelle les ribosomes et le matériel génétique sont contenus.
- Membrane plasmique – fine couche de phospholipides et de protéines qui régule le mouvement des nutriments dans et hors de la cellule.
- Paroi cellulaire – structure rigide qui entoure la cellule et protège la membrane plasmique.
- Capsule – troisième couche qui aide à prévenir le dessèchement de la bactérie ou à empêcher qu'elle soit engloutie par des microorganismes plus gros (présente uniquement dans certains types de bactéries).
- Nucléoïde – amas de matériel génétique (ADN).
- Flagelle – prolongement cellulaire qui aide les bactéries à se déplacer et à percevoir leur environnement.

La paroi cellulaire est une des plus importantes structures d'une cellule bactérienne et elle a plusieurs fonctions. La paroi cellulaire bactérienne empêche la bactérie d'éclater et l'aide à conserver sa forme. Elle permet également de réguler le passage de molécules vers l'intérieur et l'extérieur de la cellule. L'épaisseur de la paroi cellulaire aide par ailleurs les scientifiques



**Figure II.4 :** Morphologie bactérienne.

## 2.6. Nutrition Bactériennes

Pour survivre et se multiplier, les bactéries ont besoin d'une quantité plus ou moins importante de substances minérales et organiques dites substances alimentaires ou nutriments.

La dégradation de ces aliments, que l'on met à leur disposition dans les milieux de culture, va leur fournir les éléments simples (Carbone, Azote, Minéraux), et l'énergie, qu'elles vont réutiliser pour synthétiser leurs propres constituants structuraux et enzymatiques.

Les bactéries ont toutes un certain nombre de besoins communs tels : l'eau, une source d'énergie, une source de Carbone, une source d'Azote et des éléments minéraux.

D'ailleurs, en examinant la composition chimique de la cellule bactérienne, on peut deviner ses besoins nutritifs :

-La bactérie est faite en majorité d'eau : 75 à 80 % de son poids total

-La matière sèche est faite de protéines (55%), ARNr (16,7%), ARNt (3%), ARNm (0,8%), DNA (3,1%), lipides (9,1%), Lipopolysaccharides (3,4%), Peptidoglycanes (2,5%), vitamines (2,9%) et ions inorganiques (1,0%).

➤ Donc, la bactérie aura besoin de 3 types d'éléments nutritifs :

Besoins élémentaires et énergétiques, Des besoins spécifiques, Les facteurs physiques.

### 2.6.1. Besoins élémentaires et énergétiques

#### ❖ Besoins élémentaires :

-L'eau

-En grande quantité: **l'oxygène**, **l'hydrogène**, **l'azote** 10 à 15% pour les protéines, **le carbone** 40 à 50% pour toutes les molécules organique (autotrophe absence de composés organique ; hétérotrophe présence des composés organiques), **le phosphore** (phosphate inorganique) 3% pour les ADN / ARN pour les coenzymes et ATP, **le soufre** 0.1-1% pour AA ; protéines (groupement thiol).

-En quantité plus faible : des ions minéraux (Mg, K, Cl, Fe, Co...)

-Sous forme de trace : des oligoéléments (Cu, Zn, Mn,...).

#### ❖ Besoins énergétiques :

-Il convergent les dépenses engagées dans les processus catabolisme et biosynthèse.

-Les bactéries peuvent utiliser comme source d'énergie :

- Soit l'énergie lumineuse (bactéries phototrophes),
- Soit l'énergie fournie par les processus d'oxydoréduction (bactéries chimiotrophes).

-Les bactéries phototrophes font appel à des composés minéraux ou organiques comme sources d'électrons.

- Si le substrat oxydable est minéral, la bactérie est dite photolithotrophe
- Si le substrat oxydable est organique, la bactérie est dite photoorganotrophe
- Si le donneur d'électrons est un corps minéral, la bactérie est dite chimiolithotrophe
- Si le composé est organique, la bactérie est dite chimioorganotrophe (bactéries pathogènes d'intérêt médical, de contamination alimentaire, d'usage industriel...).

### 2.6.2. Substances spécifiques :

- Ce sont des métabolites essentiels dont certaines bactéries ont besoin et qu'elles sont incapables de synthétiser par défaut enzymatique.
- On les appelle facteur de croissance.
- Ils peuvent appartenir à la classe des acides aminés des bases puriques et pyrimidiques ou des vitamines.
- Les besoins quantitatifs sont de l'ordre de 10 microgrammes pour la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> classe et de l'ordre de 1 microgramme pour la 3<sup>ème</sup> classe.
- Les facteurs de croissance présentent des caractères communs :

-Ils sont actifs à concentration infime.

-Ils sont étroitement spécifiques.

Les bactéries exigeant des facteurs de croissance sont appelées : Bactéries auxotrophes.

Les bactéries non exigeantes sont dites : Bactéries prototrophes.

### 2. 6.3. Facteurs influençant la croissance

-Les facteurs physiques

-la température (Bactéries mésophiles  $T^{\circ}$  optimale de croissance = 20-40°C, Bactéries thermophiles  $T^{\circ}$  optimal de croissance = 45-65°C .ex. Bacillus et clostridium, Bactéries psychrophiles  $T^{\circ}$  optimale = 0°C de réfrigération mais multiplication abondante à 10°C ou 20°C .ex. Pseudomonas et Acinetobacter, Bactéries cryophiles  $T^{\circ}$  optimale de croissance inférieur à 0°C

-Le pH

-La Pression Osmotique

-Pression partielle d'oxygène (Bactérie aérobie stricte, Bactérie microaérophile, Bactérie anaérobie stricte).

### 2.7. Croissance bactériennes

Croissance bactérienne est l'accroissement ordonné de tous les composants de la bactérie. Elle aboutit à l'augmentation du nombre de bactéries. [24]

Au cours de la croissance, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et, d'autre part, un enrichissement en sous-produits du métabolisme, éventuellement toxiques. La croissance peut être étudiée en milieu liquide ou solide.

#### 2.7.1. Courbe de croissance

La croissance d'une bactérie s'étudie en milieu liquide. Il existe 6 phases dont l'ensemble constitue la courbe de croissance.

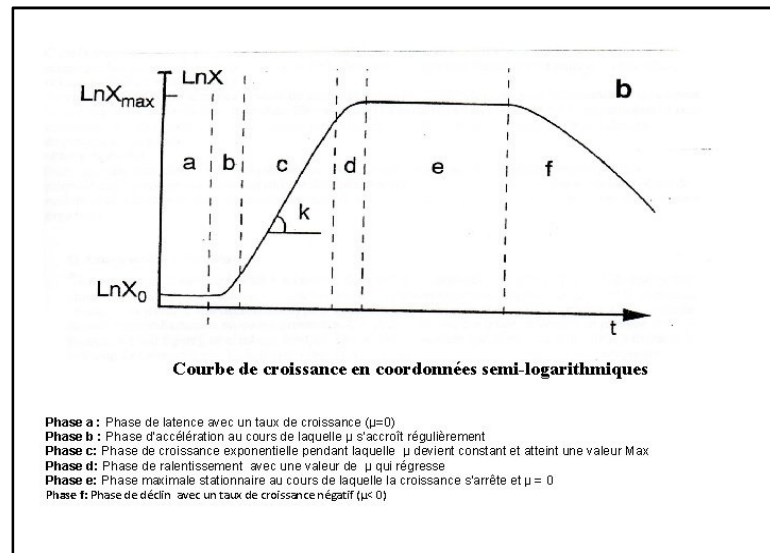
**2.7.1.1. Phase de latence :** le taux de croissance nul ( $\mu = 0$ ). La durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu. C'est le temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat (pas de phase de latence si repiquage sur milieu identique au précédent).

**2.7.1.2. Croissance exponentielle :** le taux de croissance atteint un maximum ( $\mu = \mu_{max}$ ). Cette phase dure tant que la vitesse de croissance est constante. Le temps de doublement des bactéries est le plus court. La masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle).

**2.7.1.3. Phase de ralentissement :** la vitesse de croissance régresse. Il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets. Il existe un début d'autolyse des bactéries.

**2.7.1.4. Phase maximale stationnaire :** le taux de croissance devient nul ( $\mu = 0$ ). Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.

**2.7.1.5. Phase de déclin :** le taux de croissance est négatif ( $\mu < 0$ ). Toutes les ressources nutritives sont épuisées. Il y a accumulation de métabolites toxiques. Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes. Cependant, il persiste une croissance par libération de substances libérées lors de la lyse (croissance cryptique) de.



**Figure II.5 :** Courbe de croissance bactérienne.

### 2.7.2. Croissance in vitro (milieux liquide et solide)

Les bactéries peuvent être cultivées en milieux liquide, solide et semi-liquide. Les milieux liquides sont utilisés pour la culture de bactéries pures. Les milieux solides ou semi-solides, à base d'agar, sont utilisés pour l'isolement de bactéries. Dans ces milieux, ont été ajoutés des nutriments favorisant la croissance des bactéries étudiées.

### 2.7.3. Croissance in vivo

In vivo, la croissance bactérienne n'est pas similaire à celle observée in vitro. Elle est beaucoup plus ralentie. La phase de latence est beaucoup plus longue. Les bactéries n'ont pas toujours tous les nutriments à leur disposition pour leur croissance. In vivo, les bactéries peuvent être phagocytées par les macrophages et les polynucléaires et être inhibées par les produits antibactériens comme le lysozyme ou le complément.

**Tableau II.1:** Temps de génération in vitro et in vivo de quelques bactéries.

Bactéries	TG in vitro (min)	TG in vivo (h)
Escherichia coli	20-40	5
Salmonella Typhimurium	20-40	3-5
Staphylococcus aureus	40	3-5
Pseudomonas aeruginosa	40	4
Vibrio cholera	20	2-5
Mycobacterium tuberculosis	120-240	24-48

### **2.8. Bactéries pathogènes pour l'homme**

Les bactéries nocives ou les bactéries pathogènes sont un large groupe de bactéries qui causent des maladies et des dommages à un individu, lorsqu'elles l'atteignent en mangeant des aliments ou de l'eau contaminée par des bactéries ou en touchant des surfaces contaminées par elles, elles commencent à se multiplier rapidement à l'intérieur du corps et libèrent toxines dangereuses qui causent des dommages aux tissus et l'infection se produit. [25]

Les scientifiques estiment que le nombre de bactéries pathogènes est inférieur à 1 % du nombre total de bactéries. Les types les plus importants de bactéries nocives qui causent des maladies sont les staphylocoques, les streptocoques et *Escherichia coli*. Les infections bactériennes sont traitées avec des antibiotiques appropriés en fonction du type de bactéries responsables de l'infection. [26]

Les maladies bactériennes sont une spécialité médicale primordiale, en raison de leur importance dans la mortalité générale des populations.

### **2.9. Les effets des antibiotiques sur les bactéries**

Les antibiotiques sont l'un des groupes pharmaceutiques utilisés pour éliminer les bactéries, et ils agissent soit en les éliminant directement, soit en arrêtant leur croissance ou en les affaiblissant afin que le système immunitaire de l'organisme les surmonte, et notre époque actuelle regorge de nombreux types des antibiotiques.

Son mécanisme d'action est d'affecter les bactéries, soit en les tuant (bactéricide) en empêchant la formation de la paroi cellulaire ou de la membrane cytoplasmique, soit en inhibant leur croissance (bactériostatique) en affectant les protéines cellulaires et les acides nucléiques de ces bactéries. Et il peut s'agir d'un inhibiteur de croissance à sa dose minimale (C.M.I) et exterminatrice à son niveau le plus élevé (C.M.B), La persistance de l'effet dépend de la dose appropriée ainsi que de la perméabilité de l'antibiotique aux tissus.

### **2.10. Etude de l'activité antibactérienne**

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques est fondée sur l'étude de la multiplication bactérienne face à un gradient de concentration réalisé en milieu de culture. le procédé le plus simple consiste à effectuer une gamme de dilutions antibiotiques en bouillon ou bien en gélose. Cette étude a lieu selon le plan expérimental suivant : [27]

Dans une série de tubes contenant un milieu liquide, on inocule le même nombre de micro-organismes soit et des concentrations croissantes d'antibiotique.

L'évolution des cultures dans chacun des tubes est suivie à l'aide des techniques habituelles de dénombrement, c'est-à-dire en mesurant le trouble microbien ou en isolant les germes sur milieux solides. De ce fait, nous pouvons tracer la courbe de croissance (nombre de bactéries en fonction du temps) qui nous renseigne sur la sensibilité du germe à un antibiotique

On peut aussi étudier la sensibilité d'un germe à un antibiotique en fonction de la concentration de ce dernier (% d'inhibition en fonction de la concentration en antibiotique).

- La concentration minimale inhibitrice (CMI)

Dans la zone de bactéricide, le nombre de survivants diminue plus ou moins fortement selon la nature de l'antibiotique testé ; la concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus petite concentration aboutissant à une destruction totale de l'inoculum bactérien (En pratique 0.01% de survivants). Elle peut être comparée avec intérêt à la CMI afin de mieux connaître l'effet antibactérien de cet antibiotique. Ces deux valeurs, CMI et CMB sont proches pour les antibiotiques dits bactéricides, et éloignées pour les antibiotiques bactériostatiques.

### **2.11. Technique de mesure (L'antibiogramme)**

L'antibiogramme est une sorte d'examen effectué en laboratoire pour tester la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis d'un certain nombre d'antibiotiques.

L'antibiogramme est une méthode d'analyse qui a pour but de déterminer la concentration minimale d'inhibition (CMI) de la croissance bactérienne en présence d'antibiotiques. Il doit tenir compte d'un certain nombre de facteurs susceptibles de modifier l'activité antimicrobienne : ces facteurs sont propres à l'antibiotique, à ses propriétés, au milieu et à la bactérie. [28]

#### **❖ L'antibiotique**

Il doit être stable et conserver son activité au cours du test, à la température de 37°C, habituellement la plus favorable à la croissance microbienne.

#### **❖ Le milieu**

Il doit avoir une composition rigoureusement définie permettant une reproduction fidèle des résultats.

#### **❖ La bactérie**

Le nombre de bactéries mises en contact de l'antibiotique devrait toujours être le même. En milieu solide, les zones d'inhibition observées autour des disques d'antibiotique sont inversement proportionnelles à l'absence de l'inoculum. L'activité métabolique de la bactérie est également en ligne de compte. En générale, les micro-organismes à croissance rapide, sont les plus sensibles à l'action antibiotique. Il est préférable en outre, que les mesures soient réalisées sur les cultures pures et non pas sur des cultures mixtes où s'exercent des antagonismes microbiens.

Les techniques de mesure de la sensibilité aux antibiotiques comprennent les méthodes de dilution en milieu liquide ou solide et celles de diffusion en milieu solide

#### **2.11.1. Méthode de dilution**

De réalisation simple, elle consiste à distribuer des concentrations croissantes de l'antibiotique choisi dans une série de tubes contenant un milieu de culture convenable et une quantité uniforme du micro-organisme à tester. Après incubation à la température optimale de croissance, on observe la galerie de tubes : le premier où la croissance est totalement inhibée, contient la plus faible concentration active d'antibiotique : c'est la concentration minimale inhibitrice (CMI). Jusqu'à présent, l'antibiogramme par dilution, difficilement applicable au cours des analyses de routine.

#### **2.11.2. Méthode de diffusion**

Lorsqu'une solution antibiotique est déposée à la surface d'un milieu gélosé, en proportion inverse de la distance à la source. Les bactéries cultivées sur la même surface entreront en contact avec différentes concentrations de l'antibiotique. Pour une concentration plus élevée

de MIC, sa croissance sera stoppée. L'inactivation se traduira alors par une zone circulaire stérile (si le sédiment est circulaire) dont le diamètre dépendra de la sensibilité de la souche. Il existe une relation linéaire entre le diamètre de la zone d'inhibition et le logarithme de la concentration à la source. La mesure comprend trois éléments : la source de l'antibiotique, les bactéries et le milieu. Des antibiotiques de différentes concentrations sont placés dans des puits parfaitement uniformes qui sont gravés sur la gélose à des distances égales, après une incubation de 16 à 24 heures. Un examen attentif des boîtes de Pétri révèle l'importance de l'inhibition. La mesure du diamètre de la zone d'inhibition peut être convertie en CMI à l'aide du graphique ou de la courbe de concordance qui exprime la relation entre ces deux valeurs.

La CMI est ensuite comparée aux niveaux thérapeutiques, c'est-à-dire à la concentration moyenne généralement atteinte au cours du traitement. La souche est dite :

Sensible :  $CMI < \text{Niveau Thérapeutique}$ .

Limite :  $CMI = \text{Taux thérapeutique}$

Résistance :  $CMI > \text{Taux thérapeutique}$

*DEUXIEME PARTIE*

**ETUDE  
EXPERIMENTALE**



**CHAPITRE III**

***Dosage d'azithromycine par  
une méthode  
spectrophotométrique d'UV***

### III. Dosage d'azithromycine par une méthode spectrophotométrique d'UV

#### 1. Introduction

Pour analyser les échantillons de médicaments afin de s'assurer leur conformité aux recettes stipulées dans les constitutions scientifique ou aux méthodes d'analyse approuvées par les fabrications de médicaments, des techniques analytique avancées sont utilisées pour le dosage les principes actifs, notamment l'analyse spectrale UV qui nous avons l'appliqués afin d'analyser notre médicament (Azithromycine).

#### 2. Matériel et méthodes

##### 2.1. Appareillage

Toutes les études spectrophotométries, en utilisant le naphthoquinone (NQ), ont été faites avec un double faisceau UV/Vis Lambda 365, ultraviolet-visible spectrophotomètre. Les spectres étaient automatiquement obtenus par le logiciel UV- Express Ver.4.1.0. Les absorbances en UV ont été mesurées en utilisant des cuves en quartz (1cm).

Les matériels suivants sont également utilisés :

- Bécher
- Balance
- Pipette graduée
- Papier filtre
- Papier aluminium
- Entonnoir
- Thermomètre
- Agitateur

##### 2.2. Produits chimiques

**2.2.1. Etalons :** l'étalon d'Azithromycine a été acheté chez la maison Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

**2.2.2. Produits pharmaceutiques :** les produits pharmaceutique utilisés au cours de cette étude sont : ZOTRIX ® 500 mg comprimé ; Pharmalliance, Algérie.

##### 2.2.3. Réactifs et solvants organique

- Méthanol : est un composé organique de formule  $\text{CH}_3\text{OH}$ . C'est la plus simple des alcools.
- Ethanol : ou alcool éthylique, est un alcool de formule semi-développée  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ .
- L'acétone : est un liquide transparent très inflammable et volatil utilisé comme solvant.
- NQ : 2-méthyl-1-4 naphthoquinone (Ménadione ; Vitamine K3).
- NaOH : c'est l'hydroxyde de sodium, un solide blanc.

### 3. Méthode expérimentale :

#### 3.1. Préparation des solutions de travail

❖ **Solution mère d'étalon**

La solution mère d'étalon (azithromycine) a été préparée avec une concentration de 1 mg/ml. Pour cela, une quantité déterminée de ce macrolide a été dissoute dans un mélange de l'eau et le méthanol. Les solutions de travail ont été préparées par des dilutions successives et graduelles de la solution mère.

❖ **Solution du réactif NQ**

La solution de naphtoquinone (0.2% m/v) a été préparée dans une fiole jaugée en dissolvant 0.2 g de NQ dans 100 ml de l'eau distillée. La solution a été fraîchement préparée et conservée à l'abri de la lumière.

#### 3.2. Procédure générale

Pour l'azithromycine, nous avons ajouté à 1.0 ml de notre solution d'étalon (1 mg/ml),  $X_1$  ml de NQ (0.2% m/v), puis  $X_2$  ml de l'hydroxyde de sodium (0.2 M). La solution a été complétée à 10 ml avec le solvant à une température ambiante au bout de 20 min. Les mesures d'absorbance en UV ont été réalisées à  $\lambda_{max}$ .

#### 3.3. Optimisation conditions de la dérivation chimique

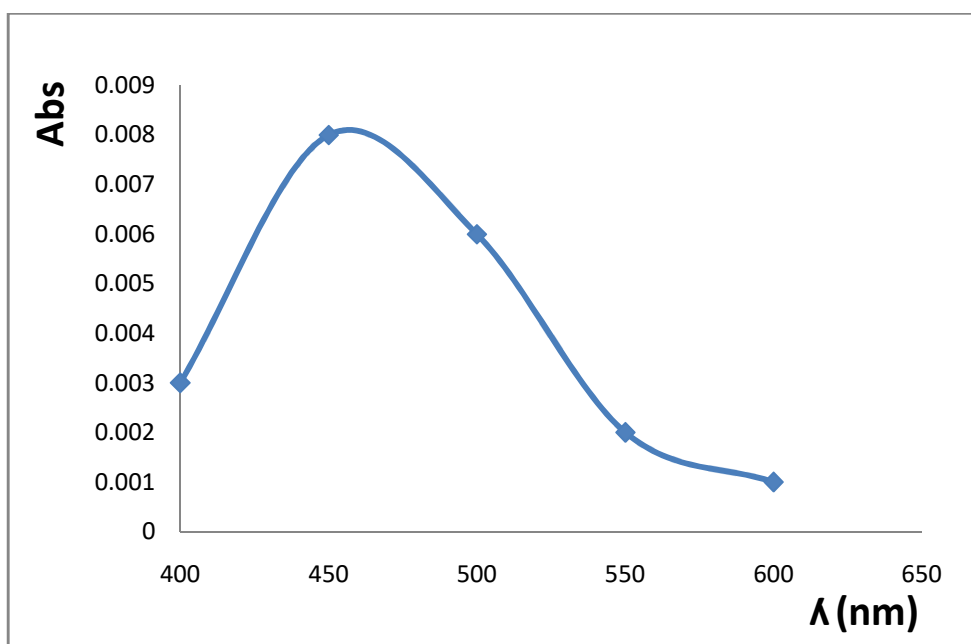
La recherche des conditions optimales a été faite d'une manière graduelle. Les paramètres qui influent sur la sélectivité sont: nature du solvant, concentration du réactif de NQ (0.25-2.5 ml), concentration de NaOH (0.25-2.5 ml), temps de réaction (5-40 min) et la température (20-80°C).

#### 4. Résultats et discussion

Il existe plusieurs des techniques d'analyse disponibles pour le dosage des antibiotiques et dans notre étude, nous avons choisi la méthode la plus simple à appliquer et la plus rapide, qui est la spectrophotométrie d'UV.

##### 4.1 Détermination de la longueur d'onde maximale

Le spectrophotomètre UV/Vis est un instrument de haute performance qui mesure l'absorption et la transmission en fonction de la concentration. C'est un moyen universel disponibles dans la majorité des laboratoires et intégré dans la plupart des appareils d'analyse.



**Figure. III.1** : Spectre d'absorption en UV du complexe AZI-NQ.

Nous avons effectué une série de mesures spectrophotométrique, après de prétraitement des échantillons avec le naphthoquinone, pour déterminer l'absorption maximale du complexe AZI-NQ, par balayage entre 400 et 600 nm (Figure III.1).

Selon les résultats obtenus et les informations données par la bibliographie, on a fixé notre choix sur la valeur 458 nm, car le complexe macrolide-NQ présent une importante absorbance en UV à cette longueur d'onde, avec des réponses optimums du détecteur.

#### 4.2 Optimisation de conditions de la dérivation chimique

##### 4.2.1 Influence de la nature du solvant

Dans notre étude, la nature du solvant est un facteur important affectant sur la réaction du NQ avec l'azithromycine. Il facilite le transfert des charges, ce qui permet la dissociation ou la stabilisation du complexe formé.

Pour voir l'influence du solvant sur la formation du complexe AZI -NQ, plusieurs solvants répandus en ce domaine ont été testés, et les résultats de cette étude sont donnés dans le tableau III.1.

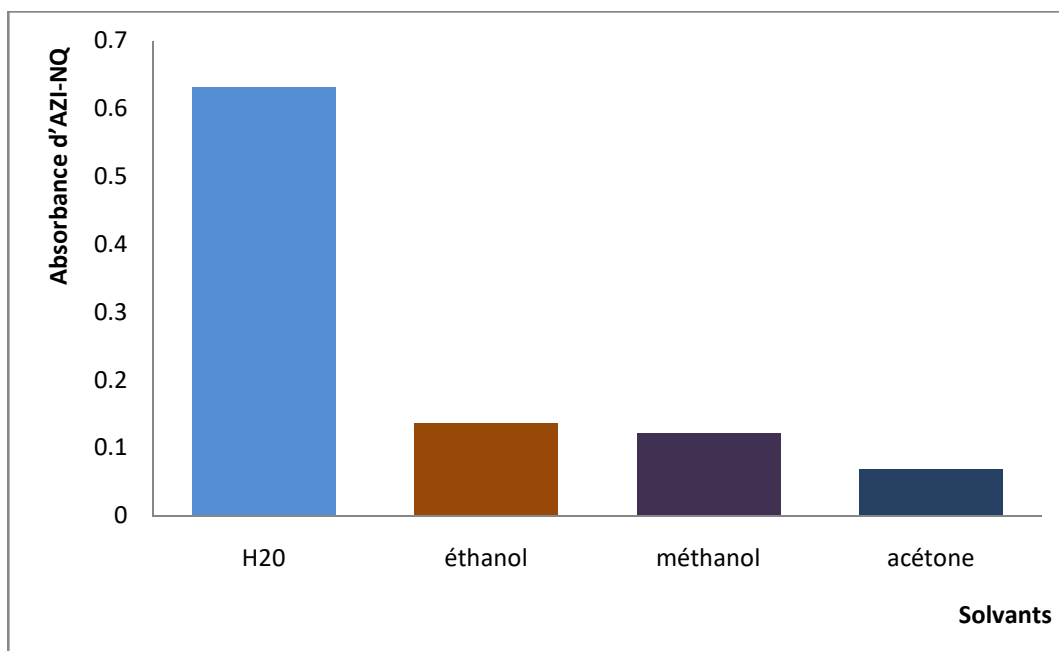
**Tableau III.1** : Influence de la nature du solvant sur l'absorbance du complexe AZI -NQ.

Solvants	H2O	Méthanol	Ethanol	Acétone
Absorbance	0.631	0.121	0.135	0.069

A la lumière de cette étude et en vu des travaux préliminaires, l'éthanol et le méthanol ont été étudiés en tant que agents intermédiaires de réaction, ce qui nous donne le même comportement que d'autres modificateurs organiques, tel que l'acétone, avec des faibles résultats.

Dans une autre étape, l'eau a été utilisée. Elle s'est avérée plus appropriée et montrée une excellente absorbance en UV. Notons que, la meilleure sensibilité du détecteur a été atteinte avec de l'eau. Ceci probablement a cause de la grande solubilité du NQ dans l'eau et de sa capacité de former des liaisons hydrogène stables avec le complexe.

Basé sur les résultats obtenus (Figure. III.2), on a conclu que le milieu aqueux (eau) est nécessaire pour l'optimisation de la réaction de notre système. Par conséquence, et afin d'obtenir la plus haute sensibilité pour notre méthode, l'eau a été choisie comme solvant pour la suite de notre travail.



**Figure. III.2** : Influence de la nature du solvant sur l'absorbance d'AZI-NQ.

#### 4.2.2 Effet de la concentration du réactif NQ

La concentration de l'agent de dérivation NQ est l'un des principaux facteurs, les plus importants, qui contribuent aux formations des dérivés d'amine (PA-NQ). L'augmentation de la concentration de NQ favorise l'activité des molécules, ce qui permet une bonne

quantification. Elle peut aussi d'augmenter la force de liaisons entre les molécules de NQ et le principe actif d'azithromycine.

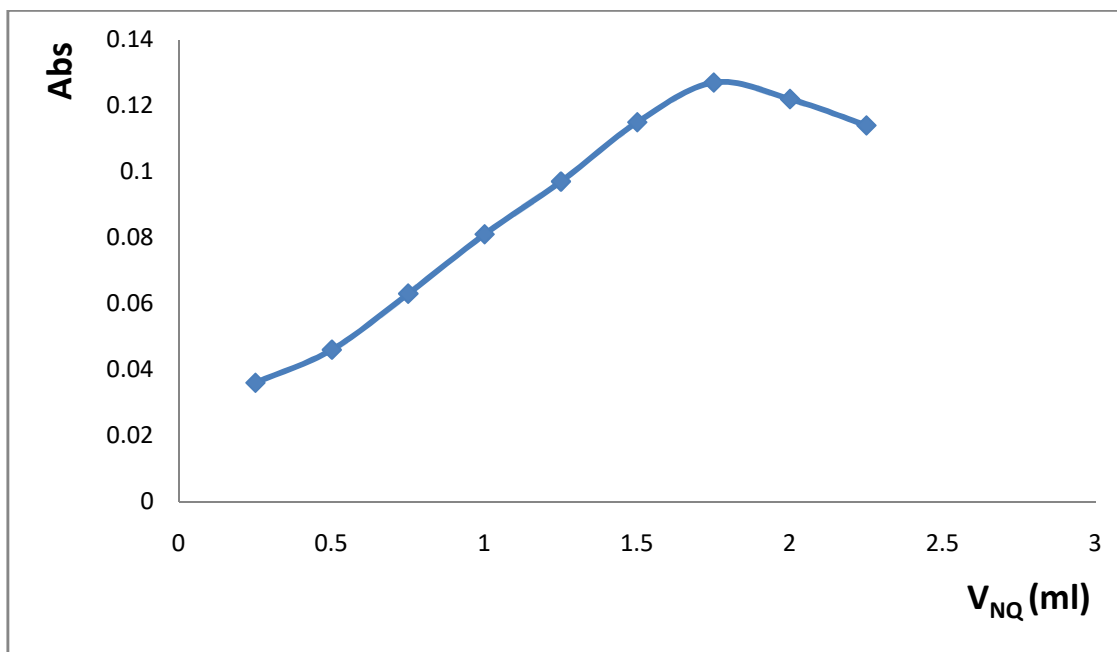
**Tableau III.2** : Effet de la concentration de NQ sur l'absorbance d'AZI-NQ.

$V_{NQ}$ (mL)	0.25	0.05	0.75	1	1.25	1.5	1.75	2	2.025	2.5
Abs (AZI-NQ)	0.036	0.046	0.063	0.081	0.097	0.115	0.127	0.122	0.114	0.103

L'étude bibliographique menée sur ce type de dérivation [29-33], montre que la concentration théorique appropriée de NQ est 0.2% (m/v). Dans cette partie du travail, nous étudions le changement des concentrations de ce réactif, pour qu'il n'ait pas d'excès de NQ, dans le but de réduire la consommation des produits avec une bonne absorbance d'AZI-NQ. Le tableau III.2 montre l'effet de la concentration de NQ sur l'absorbance du complexe formé, et la figure III.3 représente la variation de ces concentrations en fonction de l'absorbance de ce dérivé.

L'observation de cette courbe montre que l'augmentation de la concentration en NQ entraîne à un accroissement de l'absorbance dans l'intervalle de 0.25-1.75 ml. Par contre, l'absorption va diminuer à partir la valeur de 1.75ml de NQ, mais avec une faible variation. On observe également que la valeur de 1.75ml de NQ (0.2%, m/v), donne une bonne absorbance en UV, avec une bonnes formes des spectres.

Sur la base des résultats obtenus, on a décidé de choisir cette concentration de 1.75ml de NQ pour la suite des travaux.



**Figure. III.3** : Effet de concentration en NQ sur l'absorbance du complexe AZI-NQ.

### 4.2.3. Influence des volumes de NaOH

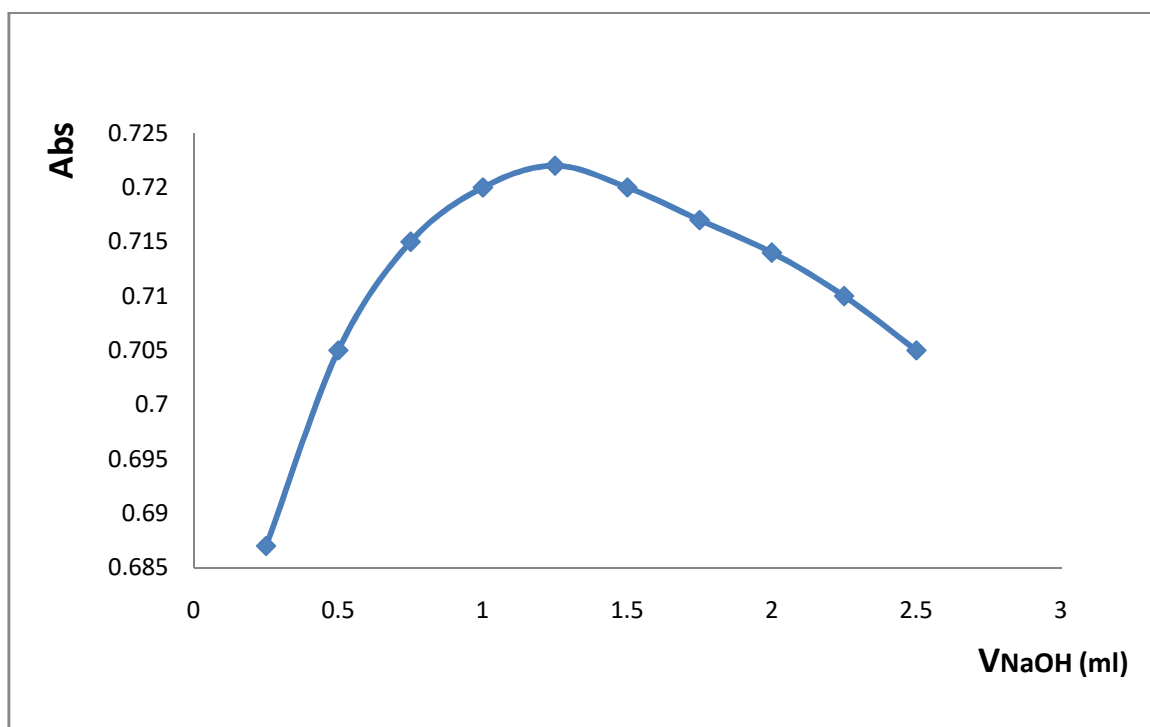
Pour montrer l'effet d'hydroxyde de sodium sur l'absorption en UV du complexe AZI-NQ, une série de mesures a été effectuée avec différents volumes de NaOH dans les 20 minutes qui suivent la préparation de l'échantillon.

Les résultats qui montrent l'influence de la concentration de NaOH sur la formation des complexes des AZI-NQ durant 20 minutes et à une température ambiante, sont donnés dans le tableau III.3.

**Tableau III.3** : Influence des volumes de NaOH sur l'absorbance du complexe AZI-NQ.

V NaOH (ml)	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00	2.25	2.50
AZI-NQ	0.687	0.705	0.715	0.720	0.722	0.720	0.717	0.714	0.710	0.705

La figure III.4 montre l'influence de la concentration de NaOH sur l'absorbance d'AZ-NQ. On a observé qu'après 20 min de l'ajout de la solution de NQ, l'absorbance de mélange augmente en fonction de l'augmentation des volumes de NaOH jusqu'à 1.25 ml. Ensuite la réponse du détecteur diminue après avoir un maximum à cette valeur de NaOH, mais avec une influence considérablement négligeable. Vu aux résultats obtenus, on a décidé de choisir cette concentration (1.25ml de NaOH) comme valeur optimale pour la suite des travaux.



**Figure. III.4** : Influence des volumes de NaOH sur l'absorbance du complexe PA-NQ.

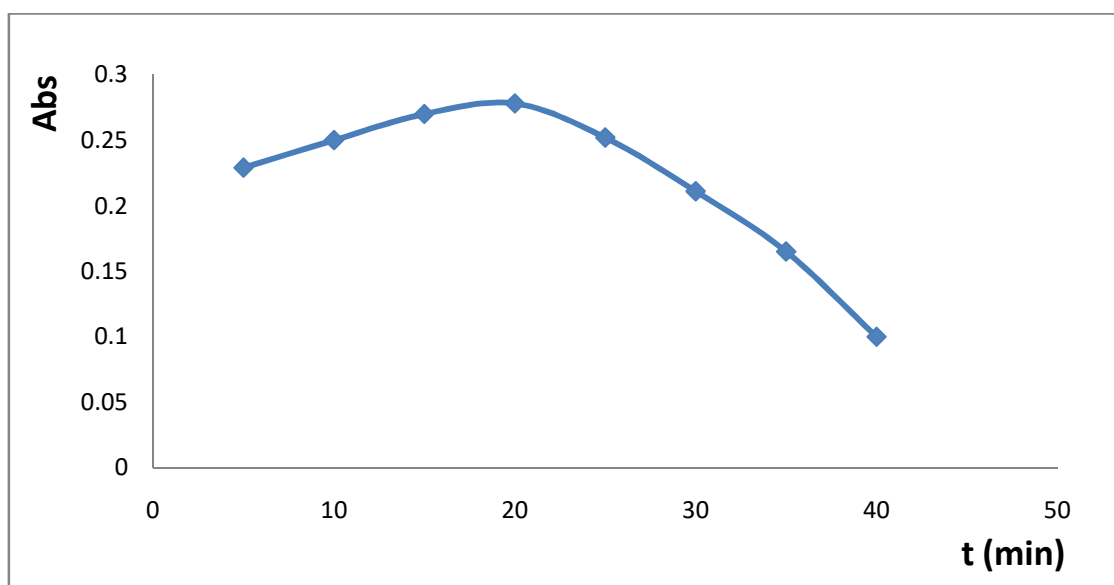
#### 4.2.4. Influence du temps de réaction

Après avoir obtenu de bons résultats d'absorbance en utilisant NQ comme agent dérivation. La durée de formation et la stabilité des complexes AZI-NQ ont été examinées. Par la suite, on a étudié l'évolution de l'absorption en UV du complexe PA-NQ en fonction du temps et les résultats obtenus sont reportés dans le tableau III.4.

**Tableau III.4** : Influence du temps de la réaction sur l'absorbance du complexe AZI-NQ.

Temps (min)	5	10	15	20	25	30	35	40
Abs	0.229	0.250	0.270	0.278	0.252	0.211	0.165	0.100

La figure III.5 montre la variation d'absorbance de complexe formé en fonction du temps de la réaction, dans une période de 40 minutes. On peut observer que, cette absorption en UV de composé PA-NQ reste presque stable jusqu'à 20min avec une bonne absorbance à cette valeur. La réaction de dérivation donne des bons résultats pendant 20 minutes, formation du complexe AZI-NQ. Donc, la période de 20 minutes a été choisie comme valeur optimale pour la suite des travaux.



**Figure. III.5** : Influence du temps de réaction sur l'absorbance du complexe AZI-NQ.

#### 4.2.5. Influence de la température

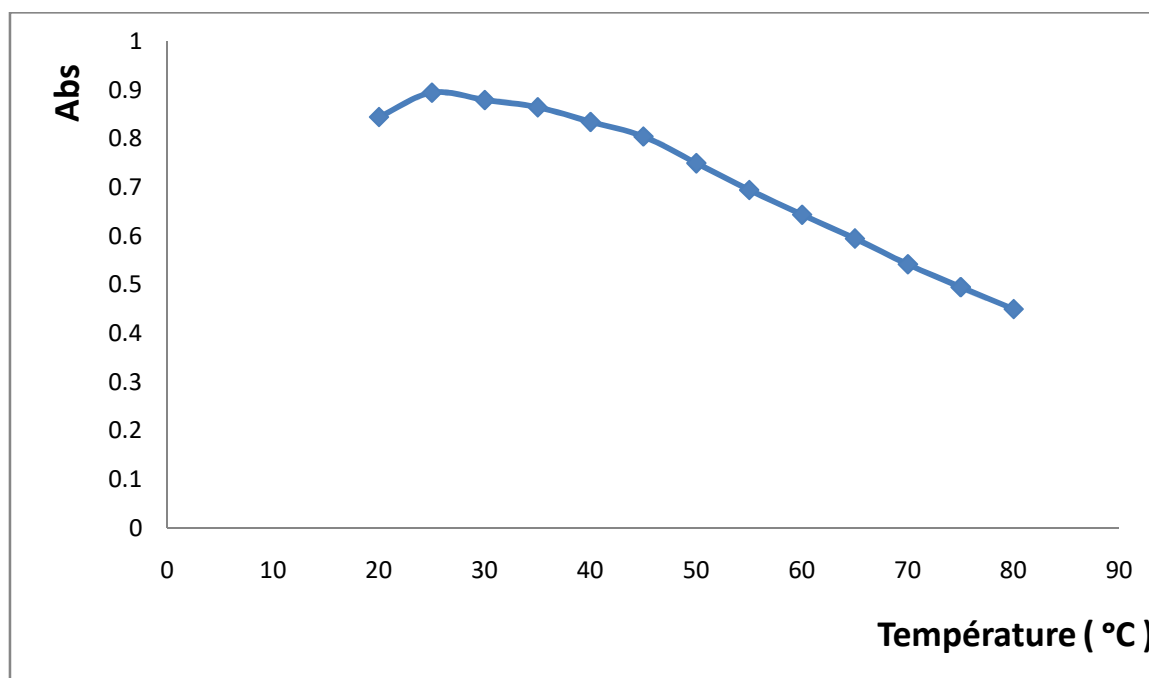
La température joue un rôle important dans les réactions chimiques, elle peut activer ou provoquer le système réactionnel. Pour montrer l'effet de la température sur la réaction de dérivation entre le macrolide AZI et le NQ sur la stabilité des complexes formés, nous avons choisi huit valeurs de température d'étude, qui sont : 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70 et 80 °C.

Les absorbances du complexe AZI-NQ formés à différentes températures (20-80 °C) ont été enregistrées et les résultats sont regroupés dans le tableau III.5.

**Tableau III.5:** Influence de la température sur l'absorbance du complexe PA-NQ.

<b>T (°C)</b>	20	25	30	35	40
<b>Abs</b>	0.845	0.895	0.880	0.865	0.835
<b>T (°C)</b>	45	50	55	60	65
<b>Abs</b>	0.805	0.750	0.695	0.644	0.595
<b>T (°C)</b>	70	75	80		
<b>Abs</b>	0.542	0.495	0.450		

Les résultats obtenus (Figure. III.6), des absorbances du complexe AZI-NQ, ont révélé que l'augmentation de la température avait un effet négligeable sur la réaction (dans les limites). Il a été constaté que, les complexes ont été formés instantanément à une température ambiante, et que la réaction n'a pas été affectée par le facteur de température. Ceci est probablement attribué à l'instabilité du complexe AZI-NQ. Par conséquent et vu aux résultats obtenus, notre choix a été fixé sur la température ambiante (25 °C) comme valeur optimum et plus pratique.

**Figure. III.6 :** Influence de température sur l'absorbance du complexe AZI-NQ.

### 4.3. Validation de la méthode d'analyse

#### 4.3.1. Fonction de réponse et linéarité

Dans la condition optimale décrite, la courbe d'étalonnage d'azithromycine a été construite en traçant l'absorbance d'AZI-NQ en fonction de la concentration d'azithromycine (Tableau III.6 et Figure III.7).

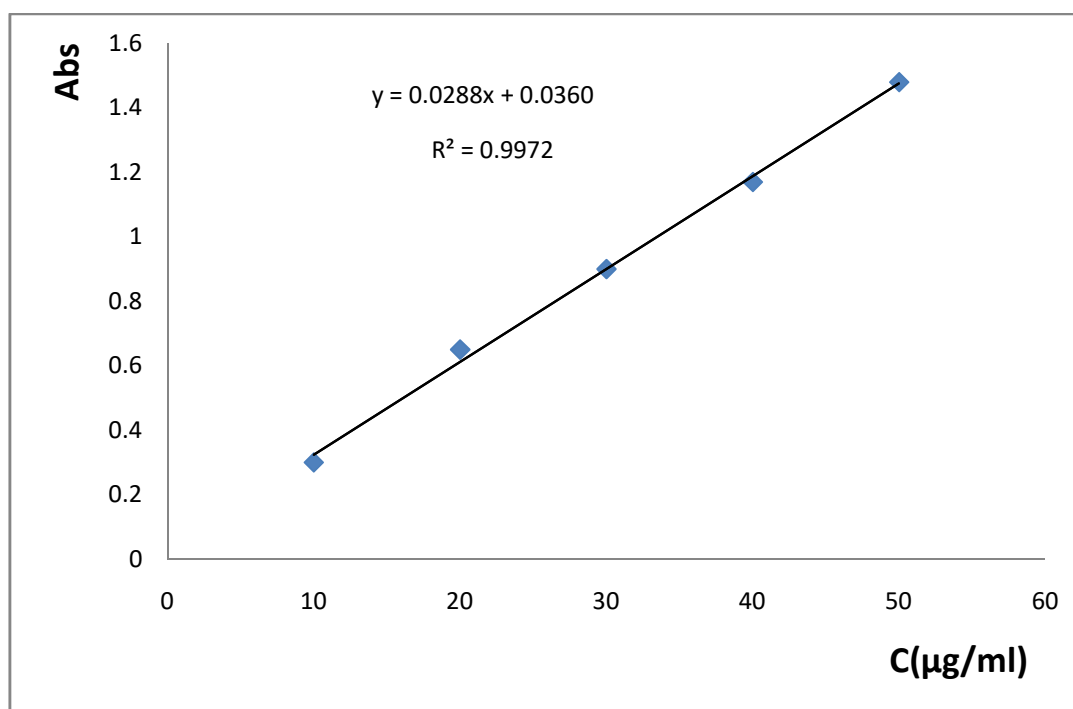
La conformité de la loi de B er-Lambert doit être évidente dans la gamme des concentrations étudiées. L'équation de régression, la gamme de concentrations et le coefficient de corrélation ont été reportés dans tableau III.7.

D'après les résultats obtenus, la loi de B er-Lambert était respectée dans la gamme de concentrations de 10-50  $\mu\text{g/ml}$ . Une corrélation linéaire entre l'absorbance du complexe formé (PA-NQ) et la concentration d'azithromycine a été trouvée.

La valeur de coefficient de corrélation était supérieure à 0.990, indiquant la bonne linéarité de la méthode dans la gamme de concentration étudiée.

**Tableau III.6** : Linéarité : changement de variables de PA-NQ en milieu aqueux.

C ( $\mu\text{g/ml}$ )	10	20	30	40	50
Abs (PA-NQ)	0.300	0.650	0.900	1.170	1.480



**Figure. III.7** : Courbe d'étalonnage du détecteur en milieu aqueux (AZI).

**Tableau III.7**: Résultats statistique de l'étude de la linéarité d'azithromycine par la méthode spectrophotométrie UV.

Composé	Equation de calibration	R <sup>2</sup>
PA-NQ	$Y = 0.0288x + 0.0360$	0.9972

### 4.3.2. Application en milieu pharmaceutique

Pour contrôler la conformité en milieu pharmaceutique on a choisi le médicament ZOTRIX® qui contient 500 mg d'azithromycine par comprimé. Le dosage d'azithromycine en ce médicament a été réalisé par la méthode développée de spectrophotométrie d'UV.

Les rendements des analystes étaient calculés sur l'intervalle de la linéarité testée et les résultats sont reportés dans le tableau III.8. Les valeurs des rendements obtenues se situent entre 95.70 et 99.15%. Ces résultats sont satisfaisants et dans les normes internationales qui sont exigées par les autorités de réglementation pharmaceutique (Pharmacopée Européenne et d'autres). Il est prouvé scientifiquement que notre méthode développée (spectrophotométrie d'UV) est performante pour le contrôle de qualité d'azithromycine en milieu pharmaceutique.

**Tableau III.8 :** Résultats de dosage d'azithromycine (PA) en milieu pharmaceutique (ZOTRIX ® 500 mg, comprimé), par la méthode spectrophotométrie d'UV.

<b>Concentration théorique d'AZI (µg/ml)</b>	10	20	30	40
<b>Concentration expérimentale d'AZI (µg/ml)</b>	9.912	19.768	28.719	41.067
<b>Rendement ρ (%)</b>	99.12	98.48	95.73	97.78

## 5. Conclusion

Ces études réalisées ont pour objectif de doser l'azithromycine en milieu pharmaceutique (médicament) par voie spectrophotométrique ultraviolette. Notre recherche a abouti aux résultats suivants :

En utilisant 1.75ml de NQ (0.2%*m/v*) avec un volume d'hydroxyde de sodium (0.2M) de 1.25ml, nous avons obtenus des bons résultats, en travaillant à une température de 25°C au bout de 20 minutes. Les mesures d'absorbance en UV ont été réalisées à 458 nm.

Les résultats obtenus de l'analyse de produit pharmaceutique de ZOTRIX® montrent une bonne courbe d'étalonnage (linéaire) et des bons rendements.



***CHAPITRE IV***

***Dosage d'azithromycine par  
une méthode  
microbiologique***

## IV. Dosage d'azithromycine par une méthode microbiologique

### 1. Introduction

Les antibiotiques font partie des groupes pharmaceutiques utilisés pour éliminer les bactéries, soit en les éliminant directement, soit en stoppant leur croissance ou en les affaiblissant. Pour étudier leur activité et leur efficacité, il est nécessaire d'établir un contrôle de qualité soigneusement maîtrisé par le système d'assurance qualité, et l'un de ces contrôles est le contrôle microbiologique. [34] C'est ce que nous aborderons dans notre prochaine étude.

### 2. Etude l'activité antibactérienne

Pour la réalisation de cette partie du travail, nous avons utilisé la méthode de diffusion sur gélose, il s'agit d'une technique plus couramment utilisée pour évaluer l'efficacité, le spectre d'activité des antibiotiques, ou la sensibilité des micro-organismes aux agents antibactériens.

### 3. Objectif d'étude

Cette méthode microbiologique quantitative a pour but d'analyser in vitro l'antibiotique d'azithromycine (étalon), qui permettra d'établir un antibiogramme afin de doser ce macrolide en milieu pharmaceutique.

### 4. Principe de la méthode microbiologique

Le principe consiste à faire des puits sur une géloseensemencée de la souche à étudier (*Bacillus subtilis*), puis des volumes de la substance à déposer (azithromycine) et tester à une dose bien déterminée. Cette substance en question diffuse au sein de la gélose à partir des puits, et un gradient de décroissance s'établit dans le milieu autour de chaque puits.

### 5. Matériel

#### ❖ Matériel biologique

- Principe Actif: Azithromycine.
- Souche testées : Souche utilisée était *Bacillus Subtilis* (Laboratoire universitaire 20 Août Skikda).

#### ❖ Matériel non biologique

- Autoclave.
- Balance analytique.
- Etuve d'incubation 37 °C.
- Bec bunsen.
- Les flacons.
- Pipettes pasteur stériles.
- Boîtes pétri.

#### ❖ Milieux de culture et solvants

- Méthanol.
- Eau distillée.
- Gélose nutritif.

❖ **Caractéristiques de souche testées**

*Bacillus Subtilis* : Bactérie gram positif, catalase positif, aérobie pouvant se développer en anaérobie qu'on trouve généralement dans le sol mais c'est en particulier une espèce ubiquitaire, mobile, bâtonnet, longueur varie de 2 à 4  $\mu\text{m}$  et sa largeur de 0.5 à 2  $\mu\text{m}$  et faible potentiel pathogène.

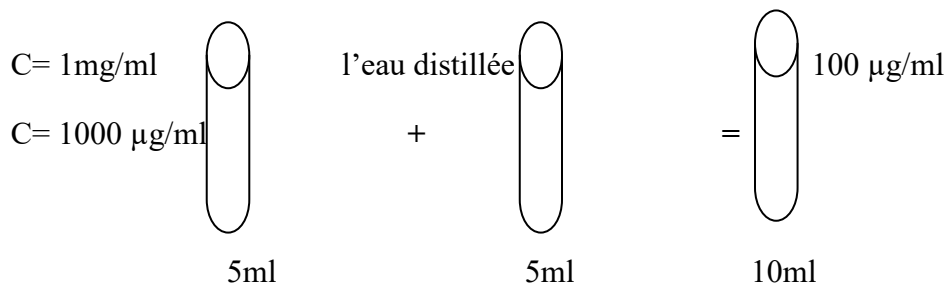
**6. Méthode expérimentale****6.1 Préparation de solutions de travail**• **Solution mère**

Nous avons préparés cette solution mère à partir de 10 mg d'azithromycine (étalon) avec 10 ml de méthanol, sous une bonne agitation pendant 10 min.

▪ **Dilutions**❖ **Préparation d'une solution de concentration  $C = 100 \mu\text{g/ml}$** 

Nous avons :  $1\text{mg} = 1000 \mu\text{g}$   $\longrightarrow$   $C = 1\text{mg/ml} = 1000 \mu\text{g/ml}$

Nous prenons 5 ml de la solution mère ajoutez 45 ml de l'eau distillée.

❖ **Préparation d'une solution de concentration  $C = 30 \mu\text{g/ml}$** 

$15\text{ml} (100 \mu\text{g/ml}) + 35\text{ml} (\text{l'eau distillé}) = 50\text{ml} (30 \mu\text{g/ml})$

❖ **Préparation d'une solution de concentration  $C = 20 \mu\text{g/ml}$** 

$20\text{ml} (30 \mu\text{g/ml}) + 10\text{ml} (\text{l'eau distillé}) = 30\text{ml} (20 \mu\text{g/ml})$

❖ **Préparation d'une solution de concentration  $C = 10 \mu\text{g/ml}$** 

$10\text{ml} (20 \mu\text{g/ml}) + 10\text{ml} (\text{l'eau distillé}) = 20\text{ml} (10 \mu\text{g/ml})$

❖ **Préparation d'une solution de concentration  $C = 0.5 \mu\text{g/ml}$** 

$15\text{ml} (1 \mu\text{g/ml}) + 15\text{ml} (\text{l'eau distillé}) = 30\text{ml} (0.5 \mu\text{g/ml})$

❖ **Préparation d'une solution de concentration  $C = 0.3 \mu\text{g/ml}$** 

$15\text{ml} (0.5 \mu\text{g/ml}) + 10\text{ml} (\text{l'eau distillé}) = 25\text{ml} (0.3 \mu\text{g/ml})$

❖ **Préparation d'une solution de concentration  $C = 0.1 \mu\text{g/ml}$**

10ml (0.3µg/ml) + 20ml (l'eau distillé) = 30ml (0.1µg/ml)

- **Milieu de culture** : gélose nutritive.

## 6.2. Action

Dans une zone stérile:

Nous avons versé la gélose dans quatre biotes de pétri et on l'a laissée à congeler.

### ❖ Préparation de l'inoculum

-Nous avons cultivé du *Bacillus Subtiles* en biote de pétri.

-On prélevé un échantillon de bactérie et on le met dans un tube écouvillon stérile contenant de l'eau physiologie, on agitant quelque minutes, et on le laisse à une température de 37°C.

### ❖ Ensemencement

-Nous avons vidé une goutte de la solution que nous avons préparée précédemment dans chaque biote de pétri.

-Au moyen de l'écouvillon stérile, nous avons essuyé toute la plaque de gélose avec une rotation d'environ 60° pour assurer une vidange égale.

-Nous répétons le processus de numérisation trois fois.

### ❖ Application des puits

- des puits sont creusés dans les milieux tests préalablement ensemencés avec un germe cible.
- 200 µl de la solution d'Azithromycine ont été déposés dans chaque puits pour chaque concentration.
- Mette les boites à l'étuve à 37°C pendant 18h à 24h.

### ❖ Lecture

- Après la période d'incubation, on procédera à une lecture des diamètres des zones d'inhibition.

## 6. Résultats et discussion

### 7.1 Linéarité

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition, de l'azithromycine, formée sur le milieu de culture de la souche testée sont indiqués dans le tableau IV.1.

**Tableau IV.1 :** Résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm.

<b>C (µg/ml)</b>	0.1	0.3	0.5
<b>C (ng/ml)</b>	100	300	500
<b>Log [C (ng/ml)]</b>	2	2.477	2.698
<b>Zone d'inhibition (mm)</b>	12.5	15	16.7

A partir des résultats du tableau IV.1, nous pouvons dire que l'azithromycine présente un pouvoir antibactérien sur la bactérie utilisée de *Bacillus subtilis*. D'un autre côté, l'effet de cet antibiotique sur cette bactérie sélectionnée est diffère d'une concentration à une autre.

Les résultats de la variation des zones d'inhibition (mm) en fonction des concentrations d'azithromycine (ng/ml) sont exploités sous forme d'un antibiogramme qu'est illustrée sur la figure IV.1.

Pour bien bénéficier de la méthode microbiologique utilisée, on peut penser à l'utilisation d'une courbe d'étalonnage (antibiogramme), qui sera tracée en se servant des zones d'inhibition en fonction de du logarithme décimale ( $\log_{10}$ ) de la concentration du soluté (AZI en ng/ml), la relation entre ces deux variables doit être linéaire. Cette courbe est représentée sur la figure IV.1. L'équation de régression et le coefficient de corrélation sont regroupés dans tableau IV.2.

A la lumière de cette figure (IV.1), nous notons que la courbe d'étalonnage est linéaire, qui nous permettra par la suite de déterminer la concentration de l'antibiotique de l'azithromycine à un instant donné et ce par l'utilisation de la zone d'inhibition. La valeur de coefficient de corrélation est supérieure à 0,990, ce qui indique cette bonne linéarité de la méthode dans la gamme de concentrations allé de 0.1 à 0.5 µg/ml.

Au vu des résultats obtenus, on s'aperçoit que la souche de *Bacillus subtilis* (Gram+) présente une bonne sensibilité vis-à-vis de l'azithromycine, ce qui montre que le mode d'action d'azithromycine est indépendant de la composition de la paroi.

D'autre part, les macrolides sont actifs que sur les bacilles Gram+ et sur les *Coccis* Gram+ et Gram-, ce que confirmé avec l'azithromycine vis-à-vis la bactérie utilisée. Pour plus de précision, une comparaison globale entre la CMI d'azithromycine et celles autres, les résultats nous montrent que l'azithromycine a une concentration moyenne.

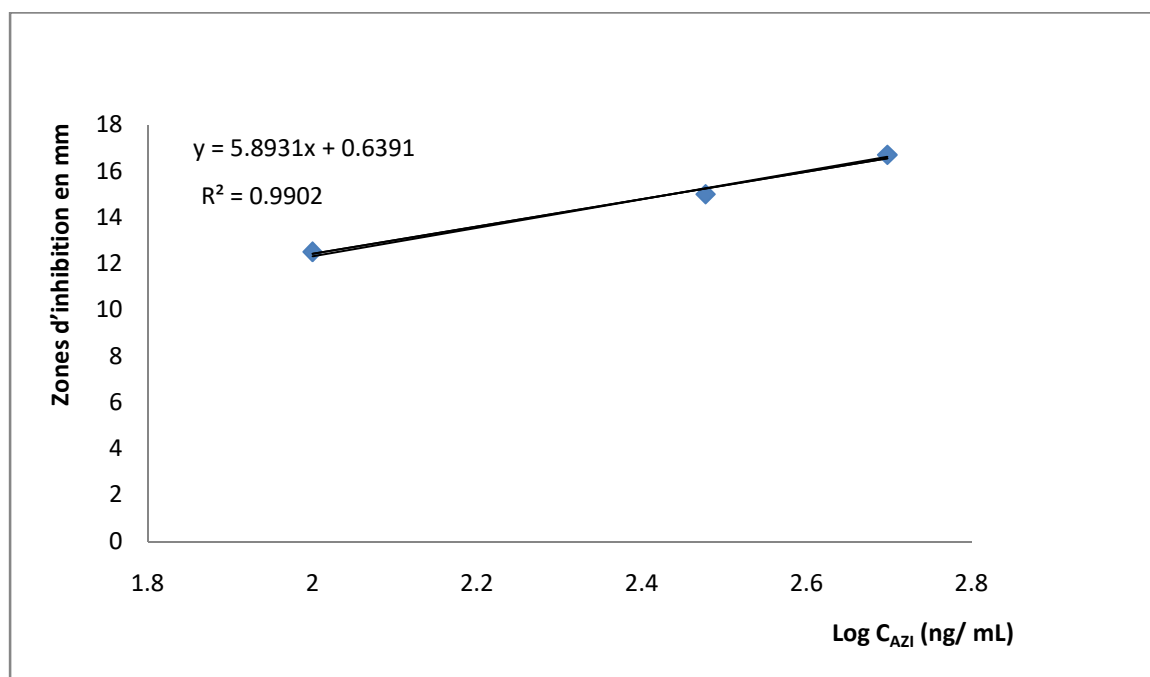


Figure IV.1: Courbe d'étalonnage de la méthode microbiologique.

Tableau IV.2 : Résultats statistique de l'étude de la linéarité d'azithromycine par la méthode microbiologique.

Composé	Equation de calibration	r <sup>2</sup>
Azithromycine	Y= 5.8931x +0.6391	0.9902

## 7.2. Application en milieu pharmaceutique

Tableau IV.3 : Résultats de dosage d'azithromycine (PA) en milieu pharmaceutique (ZOTRIX ® 500 mg, comprimé), par la méthode microbiologique.

Concentration théorique d'AZI (µg/ml)	0.1	0.3	0.5
Concentration expérimentale d'AZI (µg/ml)	0.095	0.288	0.492
Rendement ρ (%)	95.20	96.11	98.45

Pour montrer la performance de notre méthode microbiologique en milieu pharmaceutique on a choisi de doser l'azithromycine dans un médicament disponible en Algérie sous le nom ZOTRIX® - 500 mg. Les résultats de cette étude sont regroupés dans le tableau IV.3.

Comme on peut voir dans le tableau IV.3, les résultats obtenus par la méthode microbiologique proposée sont concordants avec les valeurs indiquées par les fabricants, et sont également dans les limites autorisées par les pharmacopées et les autres documents de validation. [35-37]

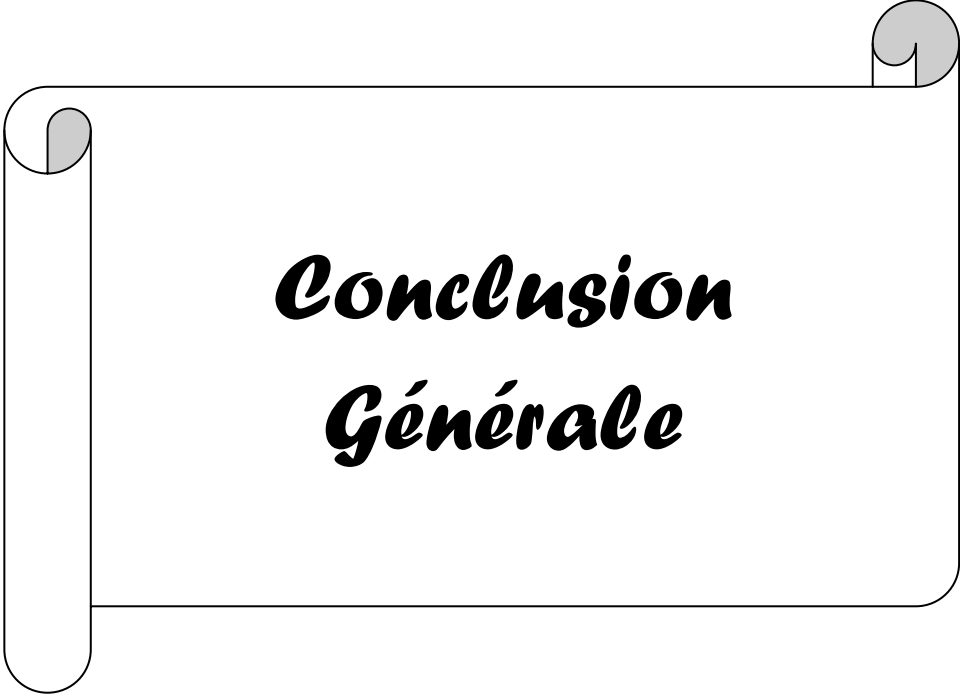
Des taux de rendement dans l'intervalle de 95,0 à 99,0% ont été obtenus, indiquant que la microbiologique mise au point est exacte et convenable pour la détermination quantitative de l'azithromycine dans le médicament de ZOTRIX® - 500mg, sans aucune interférence matricielle, ce qui démontre que notre méthode microbiologique développée est appropriée pour le contrôle pharmaceutique de l'azithromycine.

## 8. Conclusion et comparaison des méthodes

Les résultats de cette étude montrent que la méthode microbiologique est précise et linéaire à des concentrations comprises entre 0,1 et 0,5 µg/ mL. Par conséquent, elle peut être facilement adoptée pour le contrôle de qualité de routine d'AZI dans les formes pharmaceutiques.

Les résultats obtenus dans cette étude sont très satisfaisants, et la validation effectuée a prouvé que le dosage microbiologique est une bonne méthode alternative pour le dosage de notre macrolide en milieu pharmaceutique. C'est un outil analytique très utile comme complément ou substituant des méthodes physico-chimiques traditionnelles (HPLC...). Cependant, la comparaison de cette méthode microbiologique avec la méthode spectrophotométrique montrent que les résultats des rendements sont très comparables.

Le choix final entre les deux méthodes est néanmoins difficile à faire, car les deux dosages répondent aux exigences de sélectivité et d'efficacité pour l'analyse quantitative. Dans l'industrie, la quantification de AZI par la méthode HPLC est précise mais plutôt coûteuse et peu pratique. [38-40] Par exemple, l'appareil HPLC est assez cher et beaucoup de solvants organiques sont également utilisés pendant l'analyse, et le temps d'analyse est assez long (environ 10 min à 1 h par échantillon). Donc, le coût de l'analyse et sa durée sont assez élevés. Par ailleurs, en utilisant le test microbiologique, tous les échantillons peuvent être testés dans plusieurs boîtes en même temps et les résultats peuvent être obtenus en 24 h, ou avec un temps d'analyse relativement court (environ 10 min) par la méthode spectrophotométrique développée, en utilisant des réactifs et des solvants organiques moins cher.



***Conclusion  
Générale***

## Conclusion Générale

Dans notre travail, nous nous intéressons au dosage analytique et pharmaceutique d'un médicament à base de l'antibiotique azithromycine, par deux méthodes spectrophotométrique et microbiologique.

La méthode d'analyse du principe actif de l'AZI est Validée en vérifiant le paramètre de a linéaire qui est le plus important dans l'estimation quantitatif et qualitatif.

Lors de la première partie de ce travail expérimental, nous avons préféré d'améliorer la méthode de dérivation chimique par le NQ, qui nous a permis d'évaluer l'AZI par la détection en UV et les résultats de cette étude sont tout à fait satisfaisants.

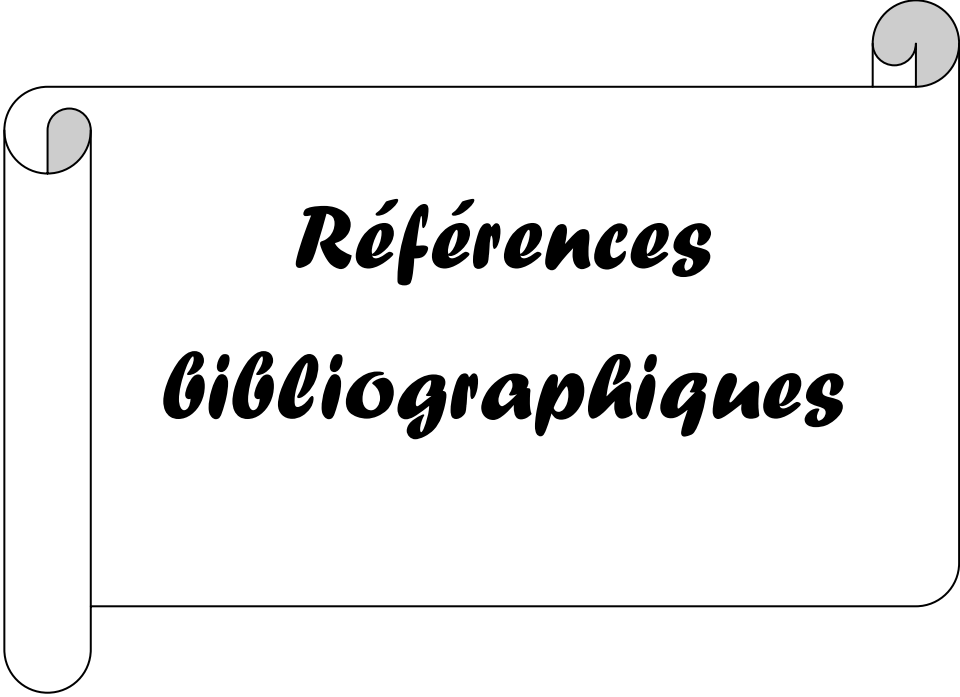
Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons analysé microbiologiquement l'AZI, lors d'une série d'expériences sur un type de bactérie prototype (*Bacillus subtilis*), par la méthode de diffusion.

Le but de cette étude était de tracer une courbe d'étalonnage destinée à nous permettre d'analyser quantitativement l'AZI dans le milieu pharmaceutique (ZOTRIX® - 500mg).

Les résultats de cette étude portant sur le dosage d'AZI dans le médicament sélectionné. Il a été constaté que, cet antibiotique peut être pris globalement avec une précision acceptable et que les résultats obtenus par les deux méthodes analytiques sont très encourageants et montrent une bonne détermination quantitative. Cependant, ils se caractérisent par légères différences dans les valeurs obtenues dans certains cas, et cela est dû aux spécificités de chaque technique.

En regardant de résultats obtenus, nous constatons que la méthode ultraviolette est plus efficace, en raison de sa dépendance aux valeurs exactes tirées de l'appareil UV. En contrairement, la méthode microbiologique est dépend à l'organisme microbiologique et aux ses conditions de vie. Il est plus facile à analyser l'AZI par cette méthode en toute simplicité, en raison de sa disponibilité dans la majorité des laboratoires. Contrairement à la méthode de spectrophotométrie UV, qui repose sur des produits chimiques et d'appareil UV, qu'est souvent très coûteux et donc pas toujours disponible, en particulier dans certains pays en développement du tiers monde. [41-44]

En conclusion, nous disons que chaque méthode dépend aux ses caractéristiques qui la distinguent. Donc, on peut dire que les deux méthodes (microbiologique et spectrophotométrie UV) sont efficaces pour l'analyse de l'azithromycine en milieu pharmaceutique.



***Références  
Bibliographiques***

## Références bibliographiques

- [1] Anonyme, Antibiotique, <https://sante.lefigaro.fr/fiches/antibiotique/definition-quest-ce-que-cest>
- [2] J.P. Escande, Une relecture de la découverte des antibiotiques, Association française pour l'avancement des sciences, Paris, 1989, p. 224–227.
- [3] M. Neuman (Ed.), Vade-Mecum des antibiotiques et agents chimiothéraiques antiinfectieux: Macrolides, 4<sup>ème</sup> Edition, Maloine, Paris, 1979, pp. 295–311.
- [4] T. Eberlin (Ed.), Les Antibiotiques: classification, mode d'action, utilisation thérapeutique, Nathan, 1994, pp. 9–23.
- [5] A.G. Dassaud (Ed.), Le médical universel, Dictionnaire médical, JO, 1990.
- [6] [1] S. Omura (Ed.), Macrolide antibiotics, chemistry, biology, and practice, 2nd ed., Academic Press, London, 2002.
- [7] W. Schanfeld, H. A. Kirst (Eds.), Macrolide antibiotics, Edition Birkhauser, Berlin, 2002.
- [8] A. Bryskier, A. Byskier, E.B. Bérézin (Eds.), Antibiotiques, Agents antibactériens et antifongiques, Macrolides, Edition Ellipses, 1999, pp. 498–561.
- [9] A. Bryskier, C. Agouridas, J.C. Gasc, in: A. Bryskier, J.P. Buzler, H.C. Neu, P.M. Tulkens (Eds.), Macrolides, chemistry, pharmacology and clinical uses, Arnette-Blackwell, Oxford, 1993, pp. 24–29.
- [10] J.Poisson (Ed.), Médicaments antibiotiques, macrolides et antibiotiques apparentés, Edition AFECT, 1992, pp. 355–386.
- [11] N.H. Steigbigel (Ed.), Macrolides and clindamycin. In : G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin (Eds). Principles and practice of infectious diseases, Churchill Livingstone, New York, 1995, pp. 334–46.
- [12] R. Leclercq, P. Courvalin, Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification, Antimicrob. Agents. Chemother. 35 (1991) 1267–1272.
- [13] J.M. Aiache, S. Aiache, R. Renoux, Les comprimé, In : Initiation à la connaissance du médicament, 4<sup>ème</sup> édition, Masson, 2001, pp. 155-67.
- [14] C. Meunier, Opinion vis-à-vis des médicaments génériques, Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Rouen, 2003.
- [15] P. Wehrle, Comprimés, In : Pharmacie galénique, formulation et technologie pharmaceutique, Maloine, 2007, pp. 53-70.
- [16] G. Burgot, J. Burgot, Méthodes instrumentales d'analyse chimiques et applications, 2<sup>e</sup> édition, Lavoisier, Paris, 2006.
- [17] A. Meyer, D. Denier, Spectroscopie pratique dans le domaine du visible et de l'ultraviolet, Bull. Un. Phys. 784 (1996) 895 – 908.
- [18] R. Kellner, J-M. Mermet, M. Otto, H.M. Widmer, Analytical chemistry, Wiley-VCH, États-Unis, 1998.
- [19] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique, Edition Masson, Paris, 1997.

- [20] A. Rouessac, F. Rouessac, *Analyse clinique: Méthodes et techniques instrumentales modernes*, 5ème Edition, Dunod, Paris, 2000.
- [21] J.L. Avril, *Nouveau dictionnaire pratique de bactériologie clinique*, Edition Ellipses, Paris, 1997.
- [22] L-M. Prescott, J-P. Harley, D-A. Klein, *Microbiologie*, 2ème édition, De Boeck, 2003, pp. 808-809.
- [23] J.P. EUZEBY, *Abrégé de bactériologie générale et médicale à l'usage des étudiants de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse*, 2012
- [24] V. Chriqui, H. Monange, D. Gorges, V. Senne, *Les bactéries résistantes aux antibiotiques*, Centre d'analyse stratégique, 299 (2012) 1-11.
- [25] F. Lamy, *Place actuelle des macrolides en pathologie infectieuse*, *Louvain. Med.* 115 (1996) 705–715.
- [26] A. Bryskier, M.T. Labro, *Macrolides: nouvelles perspectives thérapeutiques*, *Press. Méd.* 23 (1994) 1762–1766.
- [27] J.L. Bourdon, N. Marchal, *Techniques bactériologiques*, Edition Doin, Paris, 1973.
- [28] A. Thabaut, J.L. Durosoir, *L'Antibiogramme: Méthodes classiques et méthodes automatisées*, *Med. Mal. Infect.* 9 (1979) 490–495.
- [29] H.Y. Wang, L.X. Xu, Y. Xiao, J. Han, *Spectrophotometric determination of dapsone in pharmaceutical products using sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic as the chromogenic reagent*, *J. Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 60 (2004) 2933–2939.
- [30] A.H. Darwish, S.M. Amer, L.I. Al-Rayes, *Spectrophotometric study for the reaction between fluvoxamine and 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate: kinetic, mechanism and use for determination of fluvoxamine in its dosage forms*, *J. Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 72 (2009) 897–902.
- [31] A.A. Elbashir, A.A. Ahmed, S.M.A. Ahmed, H.Y. Aboul-Enein, *1,2-Naphthoquinone-4-sulphonic acid sodium salt (NQS) as an analytical reagent for the determination pharmaceutical amine by spectrophotometry*, *Appl. Spectrosc. Rev.* 47 (2012) 219–232.
- [32] A.A. Elbashir, H.E.A. Elwagee, *Spectrophotometric determination of pyrimethamine(PYM) in pharmaceutical formulation using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate (NQS)*, *J. Assoc. Arab Univ. Basic Appl. Sci.* 11 (2012) 32–36.
- [33] S. Ashour, R. Bayram, *Novel spectrophotometric method for determination of some macrolide antibiotics in pharmaceutical formulations using 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate*, *J. Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 99 (2012) 74–80.
- [34] L. K. Bekele, G. G. Gebeyehu, *Application of different analytical techniques and microbiological assays for the analysis of macrolide antibiotics from pharmaceutical dosage forms and biological matrices*, *ISRN. Anal. Chem.* (2012) 1–17, *Article ID 859473*.
- [35] Anonyme, *European pharmacopoeia*, Cevncil of Europe, Strasbourg, 2002, pp. 1745–1790.
- [36] Anonyme, *United states pharmacopoeia*, National Formulary, USP Convention Inc., Rockville, Md, USA, 2000, pp. 185–187, 424–425, 663–676.
- [37] Anonyme, *British pharmacopeia*, Stationery Office Limited, 2004, pp. 493–494, 742–743.
- [38] M.S. Mohamed, E.I. El-Nima, A.O. Nur, *Microbiological assay of clarithromycin tablets in comparison to HPLC assay*, *Sud. J. Stnds. Metr.* 1 (2007) 30–40.

- [39] P.Y. Khashaba, Spectrofluorimetric analysis of certain macrolide antibiotics in bulk and pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 923–932.
- [40] A. Fujii, S. Kobayashi, T. Tamura, Y. Akimoto, M. Komiya, H. Nishimura, H. Omata, K. Kaneko, Comparison of high-performance liquid chromatography and microbiological assay for determination of josamycin in rat serum, *J. Nihon. Univ. Sch. Dent.* 29 (1987) 93–99.
- [41] A.H. Thomas, Replacement of microbiological assay by high-performance liquid chromatographic assay for antibiotics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 5 (1987) 319–324.
- [42] I. Kanfer, M.F. Skinner, R.B. Walker, Analysis of macrolide antibiotics, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 255–286.
- [43] M.J. Gonzalez de la Huebra, U. Vincent, Review, Analysis of macrolide antibiotics by liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 376–398.
- [44] M.R. Keskar, R.M. Jugade, Spectrophotometric investigations of macrolide antibiotics: a brief review, *Anal. Chem. Insights.* 10 (2015) 29–37.

# Annexes

## *Partie de spectrophotométrie*

**Annexe 01 :** Solutions utilisées.



**Annexe 02 :** Influence de la nature du solvant.



**Annexe03 :** Effet de la concentration du NQ.



**Annexe 04 :** Influence de la température.



Annexe 05 : Appareil d'UV-Visible.



---

***Partie Microbiologique***

---

Annexe 06: Dépôt de la gélose dans les boites de pétris.



Annexe 07: Ensemencement des échantillons de *bacillus subtilis* dans le milieu de culture.



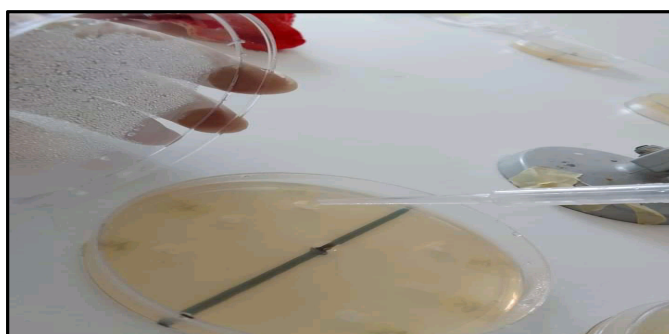
---

**Annexe 08:** Méthode des puis.



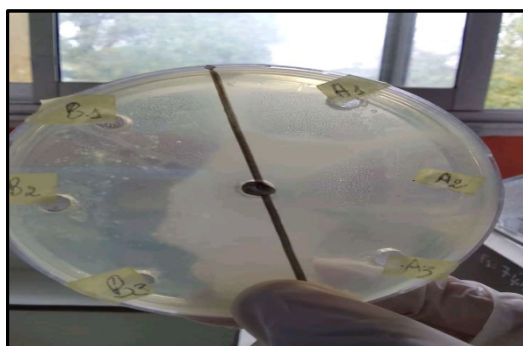
---

**Annexe 09:** La mise en place des solutions pharmaceutiques dans les puis.



---

**Annexe 10:** Résultats de diffusion du médicament.



## ملخص :

الماكروليد صنف من الأدوية وهو عبارة عن مضاد حيوي، هنالك عدة أنواع من المضادات الحيوية من بينها الأزيثروميسين، والذي يستعمل لعلاج عدد من العدوى البكتيرية وبعض الالتهابات المعوية. في عملنا هذا قمنا بتحليل الأزيثروميسين في الوسط الصيدلي بطريقتين.

في الطريقة الأولى: قمنا بتطوير الاشتقاق الكيميائي باستخدام NQ، 0.2 ك/ح و باستعمال هيدروكسيد الصوديوم ، عند درجة حرارة 25 م° ولمدة 20 دقيقة، من أجل تحليل هذا المضاد الحيوي في الوسط الصيدلاني بواسطة الأشعة فوق البنفسجية ، حيث تم الكشف عند طول موجي قدره 458 nm .

في الطريقة الثانية : استخدمنا طريقة ميكروبيولوجية تعتمد على الانتشار في وسط الآجار وهو اختبار في علم الأحياء الدقيقة. صنعنا مجموعة حفر على وسط الآجار الملقح ببكتيريا B.S ، ثم وضعنا عينات من الأزيثروميسين بتركيز مختلفة، بعد مدة 24 ساعة انتشر الدواء داخل الآجار مشكلا مناطق معرّقة. نتائج كلا الطريقتين كانت جد مرضية وبينت انها دقيقة ومضبوطة ويمكن استخدامها في التحليل الصيدلاني.

## Résumé :

Le macrolide est un médicament de la classe des antibiotiques. Il existe plusieurs types de macrolides, dont l'azithromycine qui est utilisé pour traiter un certain nombre d'infections bactériennes et certaines infections intestinales. Dans notre travail, nous avons analysé l'azithromycine en milieu pharmaceutique de deux manières :

Première méthode : Nous avons développé une dérivation chimique à l'aide de NQ (0.2m/v), en utilisant de la soude, à une température de 25 °C et après 20 minutes, afin d'analyser ce macrolide en milieu pharmaceutique par détection UV. La détection a été faite à une longueur d'onde de 458 nm.

Deuxième méthode : Nous avons utilisé la méthode microbiologique en diffusion sur gélose, qui est un test en microbiologie. Nous avons fait des puits sur la gélose inoculée avec la bactérie *Bacillus septidis* puis mis un volume d'azithromycine à différentes concentrations afin que le médicament diffuse dans la gélose à partir des puits. Les résultats des deux méthodes étaient acceptables et indiquant leurs performances pour l'analyse pharmaceutique.

## Abstract:

Macrolide is a class of antibiotic drugs. There are several types of macrolides, including azithromycin, which is used to treat a number of bacterial and intestinal infections. In our work, we analyzed azithromycin in pharmaceutical media with two ways:

First method: We developed chemical derivation using NQ (0.2m/v) and sodium hydroxide, at a temperature of 25 °C after 20 minutes, in order to analyze this macrolide in pharmaceutical medium by UV detection. The detection was done at a wavelength of 458 nm.

Second method: We used the microbiological method of diffusion on agar, which is a test in microbiology. We made wells on agar inoculated with *Bacillus Septilis* bacteria and then put volume of azithromycin in different concentrations so that the drug diffuses into the agar from the wells. The results of both methods were acceptable and indicated their performance in pharmaceutical analysis.