



Sommaire

Introduction.....	1
Centre Antipoison Du Maroc (C.A.P.M.)	3
Partie I : Rappels théoriques	
I- Tuberculose.....	8
1. Définition.....	8
2. Les cibles d'infections de la tuberculose.....	8
3. Les différentes populations des bacilles de Koch.....	9
4. Traitement de la tuberculose.....	9
II-Monographie de l'isoniazide et du Pyrazinamide.....	11
1. Isoniazide (IHN OU H)	11
a. Structure chimique de l'isoniazide.....	11
b. Propriétés physicochimiques.....	12
c. pharmacodynamie	12
d. Pharmacocinétique	13
e. Indications thérapeutiques.....	13
f. Effets indésirables	14
2. Pyrazinamide (PZA ou Z).....	14
a. Structure chimique du Pyrazinamide	14
b. Propriétés physicochimiques.....	15
c. Pharmacodynamie.....	15
d. Pharmacocinétique.....	15
e. Indications thérapeutiques.....	16
f. Effets indésirables.....	16
III- L'intérêt du dosage de l'isoniazide et du Pyrazinamide.....	16
a- L'intérêt du suivi thérapeutique de l'INH.....	17
b- L'intérêt du suivi thérapeutique du Pyrazinamide.....	17
IV- Chromatographie liquide à haute performance.....	18
1. Définition.....	18
2. Appareillage.....	18
a. Système de pompage.....	19
b. Injecteurs.....	20
c. La colonne	20
d. Détecteurs.....	20
e. Système d'acquisition de données : Intégrateur, enregistreur, unité informatique	21
3. Types de chromatographie liquide.....	21



Partie II : Validation du dosage de l'INH et du PZA par HPLC

I- Matériels et méthodes	23
1. Matériels et réactifs.....	23
2. Description de la technique.....	24
3. Optimisation de la méthode	24
4. Validation d'une méthode analytique.....	25
a. Spécificité.....	25
b. Linéarité	26
c. Répétabilité	26
d. Fidélité intermédiaire (reproductibilité)	26
II- Résultats	28
III- Discussion.....	34
Conclusion.....	36
Annexe	
Références	



Introduction

La tuberculose est une infection bactérienne chronique due à *Mycobacterium tuberculosis*. Au cours de la dernière décennie et au moment où on croyait se diriger vers l'éradication de cette maladie dans le monde, quasiment tous les pays ont enregistré une augmentation du nombre de cas d'infection. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), durant l'année 2008, 9369 mille nouveaux cas de tuberculose ont été recensés dans le monde. Ce nombre correspond à un taux d'incidence¹ de 139 nouveaux cas pour cent mille habitant et une mortalité de 1322 mille, à raison de 20 décès pour cent mille habitant². Pour cette même année, la direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies au Maroc a enregistré 25473 nouveaux cas de tuberculose toutes formes confondues sur tout le Maroc, soit 80 nouveaux cas par jour, ce qui correspond à un taux d'incidence de 80.7 nouveaux cas pour 100.000 habitants³.

Les déplacements de population (voyageurs, réfugiés de guerres, sans-abri) ainsi que la pandémie HIV/SIDA ont largement contribué, ces 40 dernières années, à la dissémination de la maladie sur toute la planète.

Le traitement de toutes les formes de tuberculose repose sur la prise régulière d'un ou de plusieurs antituberculeux. Dans le cas d'une monothérapie les bactéries développent presque toujours une résistance contre l'antituberculeux utilisé. De ce fait le traitement doit être actif en même temps sur les bacilles extra et intracellulaires afin de prévenir la sélection de mutants résistants. Une association de plusieurs antituberculeux est donc nécessaire pour un traitement efficace. Le traitement standard contre la tuberculose recommandé à ce jour par l'OMS est une association de quatre antibiotiques : Rifampicine (RIF), Isoniazide (INH), Pyrazinamide (PZA) et Ethambutol (EMB). Ce traitement doit être administré selon la stratégie thérapeutique internationale juste après que la maladie ait été diagnostiquée.

Le traitement par ces médicaments présente souvent une inefficacité thérapeutique. Des effets indésirables voir même toxiques notamment l'hépatotoxicité sont observée pour l'INH et le PZA. Ces effets sont souvent liés aux doses administrées de ces médicaments. Le suivi thérapeutique par le dosage de médicaments permet d'ajuster la posologie à chaque patient pour mieux optimiser le traitement et minimiser le risque d'effet indésirable.

Actuellement le suivi thérapeutique est réalisé pour INH et la RIF au laboratoire du Centre Antipoison et de Pharmacovigilance Marocain (CAPM). Le dosage de l'INH et de la RIF se fait par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) suivant deux méthodes différentes.

L'objectif de ce travail est le dosage du PZA par HPLC pour le suivi thérapeutique pour élargir la gamme des prestations du laboratoire vis-à-vis des médicaments antituberculeux et pour offrir aux cliniciens un outil intéressant pour améliorer l'efficacité du traitement. Ce projet porte sur la validation du dosage du PZA et de l'INH par HPLC en se basant sur la technique déjà utilisée pour le dosage de l'isoniazide. Ce rapport s'articule sur deux axes :

- Une partie théorique sur la tuberculose son traitement et les techniques de dosage des antituberculeux.
- Une partie expérimentale qui va traiter la validation du dosage de la PZA et de l'INH.

¹ - Incidence : nouveaux cas survenant pendant une période déterminée

² - site officiel de l'OMS www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/

³ - la direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies



LE CENTRE ANTIPOISON DU MAROC (C.A.P.M.)⁴

I- Présentation du centre

Le Centre Antipoison et de Pharmacovigilance du Maroc (C.A.P.M) est un service d'utilité publique mandaté par le Ministère de la Santé pour la gestion des problèmes toxicologiques à l'échelle individuelle et collective. Il assure une fonction de vigilance et d'alerte sanitaire. Les objectifs spécifiques sont la diminution du nombre total d'intoxications, et la réduction des décès et des séquelles toxiques par l'amélioration de la prise en charge du patient intoxiqué.

Ces objectifs nécessitent l'élaboration d'une Stratégie Nationale de Lutte Antitoxique qui requiert la maîtrise de la connaissance de l'état épidémiologique, la formation du personnel médical et paramédical, ainsi que la disponibilité du matériel de réanimation, des antidotes et des médicaments. Cette stratégie est basée également sur la sensibilisation et l'éducation de la population aux problèmes posés par les intoxications et leurs conséquences.

Le CAPM est composé de sept unités à savoir :

- Information Toxicologique (IT)
- Centre National de Pharmacovigilance (CMPV)
- Laboratoire de Toxicologie et de Pharmacologie (CAPM-LAB)
- Toxicovigilance (TV)
- Cellule de Communication Information (CCI)

⁴ www.capm.ma



- Assurance Qualité (AQ)
- Suivi et Logistique (SL)

Le CAPM dispose de ressources matérielles diversifiées lui permettant de recueillir les informations nécessaires à la réussite de ces différentes missions :

- * Ressources Humaines diversifiées et qualifiées
- * Fiches de recueil d'informations
- * Matériel informatique
- * Matériel de laboratoire

II- Départements du centre antipoison

1- Information toxicologique

L'Information Toxicologique consiste à délivrer l'information en toxicologie 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7, au public, aux professionnels de santé et aux autorités, concernant tout produit potentiellement toxique (médicaments, produits chimiques, plantes, animaux venimeux...).

2- Le Centre National de Pharmacovigilance

Est au service de tous les professionnels de santé des secteurs hospitaliers et libéraux (médecins, pharmaciens, dentistes, infirmiers, sages femmes et kinésithérapeutes...) Pour tout sujet concernant le médicament :

- Recueil et analyse de toute suspicion d'effet indésirable du à un médicament afin d'établir la relation de cause à effet ;
- Réponse à vos questions sur le médicament : Effets indésirables médicamenteux, pharmacodynamie, pharmacocinétique, contre-indications, interactions médicamenteuses... ;
- Aide à la prescription chez les populations à risque (insuffisants rénaux, sujets âgées, enfants, femmes enceintes ou allaitantes...) ;
- Evaluation des risques d'une exposition médicamenteuse pendant la grossesse ;
- Diffusion gratuite mensuelle d'un Bulletin d'information sur la pharmacovigilance.

3- Centre National de Toxicovigilance



La toxicovigilance est l'activité de surveillance des effets toxiques sur la santé de l'homme d'un produit, d'une substance ou d'un agent polluant chimique ou biologique afin de déclencher l'alerte, de mener à bien les actions d'information, de prévention auprès du public et de formation du personnel de santé.

4- Laboratoire de Toxicologie et de Pharmacologie

Son rôle essentiel est d'orienter un diagnostic d'intoxication. Il est chargé d'effectuer dans l'immédiat des démarches pour la recherche, l'identification ainsi que la quantification des substances chimiques.

➤ **Objectifs du laboratoire**

- Confirmer, infirmer, ou compléter un diagnostic d'intoxication.
- Surveillance thérapeutique : dosage des médicaments pour un meilleur traitement et pour l'adaptation de posologie.

➤ **Activités du laboratoire**

- **Toxicologie d'urgence**

Est spécialisé dans l'identification et le dosage des toxiques dans les liquides biologiques (sang, urines, liquide de lavage gastrique, vomissement, substance suspectes ...). Les techniques disponibles permettent de couvrir les toxiques les plus fréquemment rencontrés au Maroc. Les résultats sont communiqués immédiatement à la fin de l'analyse par téléphone au médecin demandeur.

- **Suivi thérapeutique**

Il assure le dosage des médicaments chez les patients sous traitement chronique. Le but de ces dosages est : D'éviter les surdosages qui favorisent l'apparition d'effets indésirables médicamenteux et les sous-dosages qui sont la cause d'échecs thérapeutiques.

- **Métaux lourds**

5- Cellule de Communication Information

Le rôle de cette cellule est de modifier les comportements afin d'optimiser l'efficacité de l'organisation. Ceci par un système de communication à la fois systématique, efficace et interactive.

Ce département est constitué de quatre unités

1. Centre de documentation
2. Unité de formation et de coopération
3. Unité d'Information, d'éducation et de Communication



4. Unité Informatique

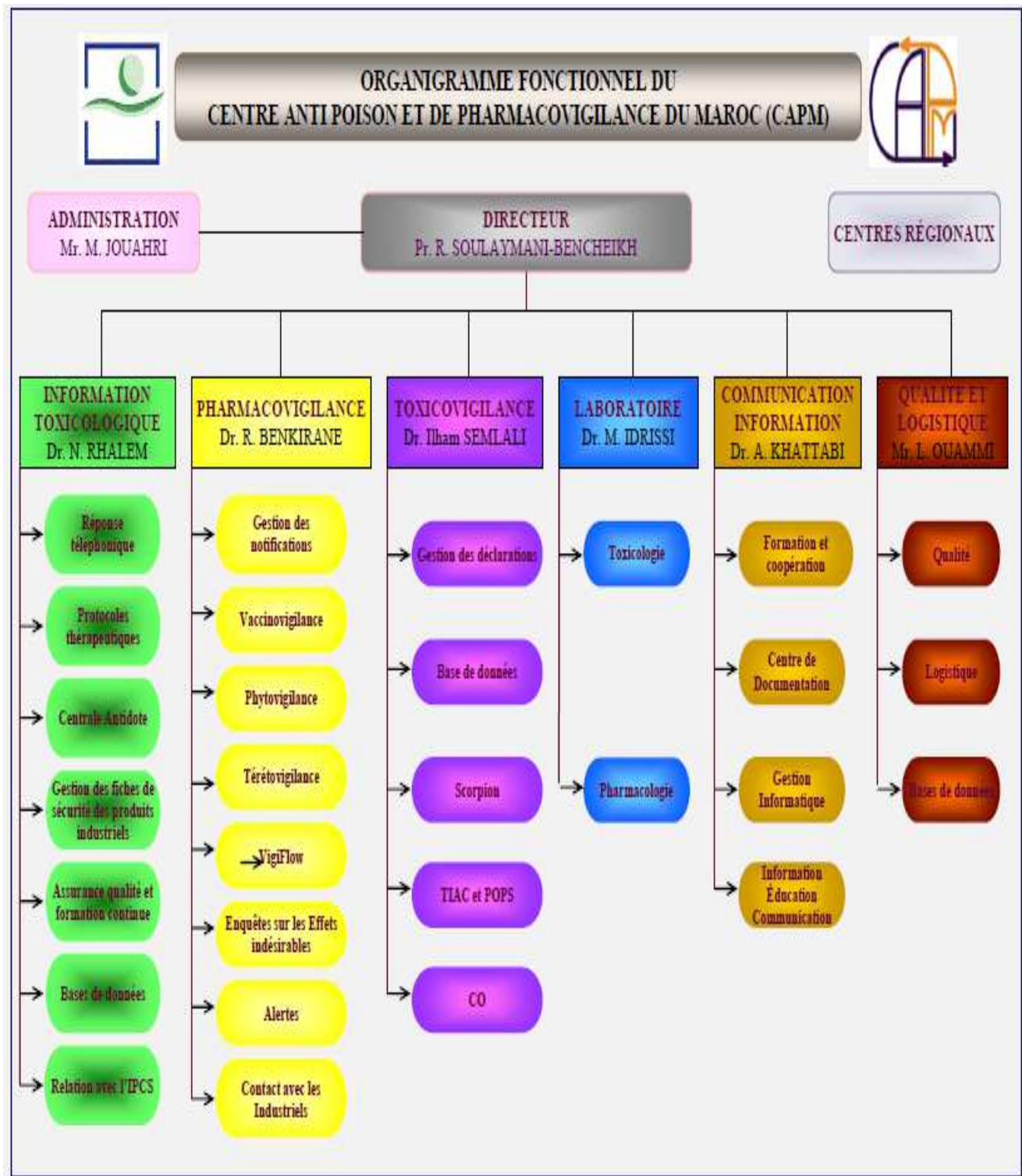
6- Assurance Qualité

Département visant à installer une démarche qualité pour certifier la conformité du CAPM à un label de qualité internationalement reconnu : la norme ISO 9001 version 2000 pour les départements médicaux et ISO 17025 pour l'accréditation du laboratoire. Son travail est basée sur l'installation de procédures d'analyses, de gestion des ressources matérielles et humaines, de suivi de l'application et l'évaluation des actions pour garantir l'amélioration des prestations, de rendement à coût moindre et de satisfaction du client.

7- Suivi et logistique

Cette unité a été créée au niveau du Centre pour :

- Assurer la centralisation de toutes les bases de données du centre, les homogénéiser et de veiller à leur sauvegarde.
- Soutenir l'administration du centre en créant des procédures de gestion et de les mettre en application.
- Organiser les audits internes, rédiger des rapports et assurer le suivi des corrections à apporter.



I- Tuberculose



1- Définition ⁵

La tuberculose est une maladie bactérienne, à transmission interhumaine. Le bacille de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*), responsable de la tuberculose, est une bactérie transmise par voie aérienne, via des gouttelettes en suspension dans l'air provenant des expectorations de malades infectés. L'inhalation de quelques gouttelettes contaminées suffit à infecter un individu. Une personne atteinte de tuberculose non traitée peut infecter de 10 à 15 personnes chaque année.

Toutes les personnes infectées par le bacille de Koch (BK) ne développent pas la maladie. Le bacille peut rester dans l'organisme à "l'état dormant", asymptomatique, pendant des années. Seuls 5 à 10 % des personnes infectées développeront une tuberculose. Les personnes immunodéprimées ont, après avoir été infectées, plus de risques d'avoir une tuberculose, particulièrement les malades du SIDA. Le virus VIH et le bacille de Koch forment, en effet, une association mortelle, chacun de ces deux agents infectieux favorise la progression de l'autre. La tuberculose est d'ailleurs la cause principale des décès des malades du sida.

2- Les cibles d'infections de la tuberculose⁶

L'infection due au bacille tuberculeux peut se présenter sous diverses formes :

- Tuberculose pulmonaire : Le poumon est la localisation la plus fréquente de la tuberculose, atteinte isolée dans 80 % des cas, ou associée à une atteinte extrapulmonaire dans 10 % des cas.
- Tuberculose extra-pulmonaire : Toutes les localisations de la tuberculose situées en dehors du parenchyme pulmonaire sont des tuberculoses extra-pulmonaires :
 - La tuberculose pleurale
 - La tuberculose des ganglions périphériques
 - Les tuberculoses des os et des articulations
 - La tuberculose urogénitale
 - La tuberculose du péricarde
 - La tuberculose digestive
 - La tuberculose neuroméningée

^{5,6} Aspects cliniques et thérapeutiques de la tuberculose chez l'enfant et l'adulte C. Billy, C. Perronne. *EMC-Maladies Infectieuses 1 (2004)* 81-98





3- Les différentes populations des bacilles de Koch⁷

Au sein d'un foyer tuberculeux, il existe trois formes principales de bacilles dont le métabolisme, et la chimiosensibilité sont variables :

- Les bacilles à métabolisme actif en milieu aérobie (extracellulaires ou intra-cavitaires), leur multiplication est continue et rapide.
- Les bacilles intramacrophagiques (intracellulaires, pour lesquels les antibiotiques efficaces devront posséder une bonne diffusion intracellulaire, ainsi qu'une activité conservée en milieu acide). Leur multiplication est ralentie par le manque d'oxygène et le pH acide du cytoplasme macrophagique.
- Les bacilles intracaséux (quiescents, ou « dormants »). Leur multiplication est stoppée, mais ils restent vivants. Ils sont capables de reprendre leur activité et de se multiplier dès que les défenses immunitaires diminuent.

4- Traitement de la tuberculose⁸

Les médicaments de première ligne sont l'Isoniazide (INH), la Rifampicine (RIF) et le Pyrazinamide (PZA) agents essentiels du traitement de la tuberculose à bacilles sensibles, Ethambutol (EMB) étant plus instamment employé. L'INH exerce l'effet bactéricide le plus puissant sur les bacilles extracellulaires en répllication active. La RIF est active sur toutes les populations bacillaires. Le PZA apporte une contribution importante à la stérilisation des lésions tuberculeuses. L'EMB est bactériostatique aux doses conventionnelles, il est utilisé en association avec des bactéricides plus puissants pour éviter l'apparition de souches résistantes. Le traitement par l'INH seul dure pendant 18 mois, l'ajout de la RIF fait diminuer la période à 9 mois, on peut raccourcir cette durée en administrant le PZA pour arriver à un traitement qui dure 6 mois. (Voir tableau 1)

Tableau 1 : Activité in vivo des antituberculeux de première ligne

⁷ Le traitement de la tuberculose en 2007. P. Tattevin / *Médecine et maladies infectieuses* 37 (2007) 617–628.

⁸ Traitement de la tuberculose. M. Albertini. *Archives de pddiatrie* 12 (2005) S 110-S116



Antibiotiques	Activité sur les bacilles			Proportion de mutants résistants au sein d'une population sensible	Apport dans le traitement
	À multiplication active (caverne) ~108 bacilles	À multiplication lente À pH acide ~108 bacilles (macrophage)	À pH neutre (foyers caséux) ~105 bacilles		
Isoniazide (INH)	++	+	0	10^{-6}	Antibiotique le plus rapidement bactéricide
Rifampicine (RMP)	++	+	+	10^{-7}	18 mois → 9 mois
Pyrazinamide (PZA)	0	++	0	$>10^{-5}$	9 mois → 6 mois
Ethambutol (EMB)	±	±	0	10^{-6}	Empêche sélection de RMP-R si résistance primaire à INH

Les médicaments de seconde ligne (éthionamide, cycloserine, capreomycine, aminosides, PAS, fluoroquinolones) sont rarement utilisés. Ils sont indiqués en cas d'intolérance ou de résistance du germe aux antituberculeux majeurs.

Un traitement curatif a pour but de détruire les bactéries présentes dans les organes infectés. Bien conduit, un traitement antituberculeux entraîne une guérison dans 99 % des cas. Même chez le sujet séropositif pour le VIH, le taux de guérison est supérieur à 95 %. Un traitement précoce permet d'éviter la dissémination de la maladie. Le traitement permet de faire cesser la contagion en 2 à 3 semaines.

Le traitement standard dure six mois (fig.1), il comporte trois antituberculeux durant les deux premiers mois de la thérapie : INH, RIF et PZA, puis, en cas de bacille sensible à tous les antituberculeux, pendant les 4 mois restants le traitement est réduit à la RIF et à l'INH. Ces médicaments peuvent être utilisés, soit séparément, soit en association fixe. L'EMB est rajouté à cette trithérapie lorsqu'il existe un doute sur une résistance à l'isoniazide.⁹

⁹Tuberculose pulmonaire de l'adulte : M.-C. Dombret. *EMC-Médecine 1 (2004) 406-416*



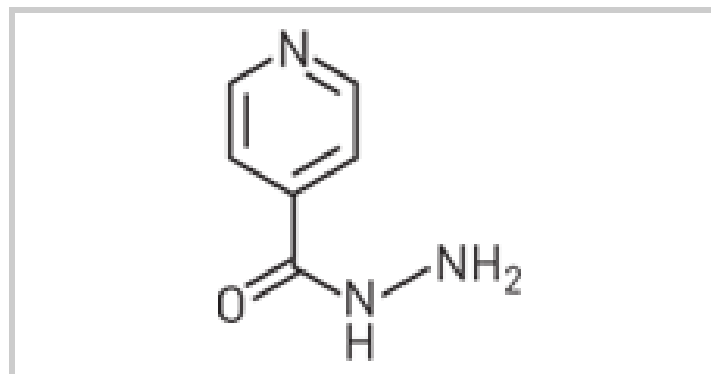
	0	1	2	3	4	5	6	Mois
Isoniazide 4-5 mg/kg/jour								
Rifampicine 10 mg/kg/jour								
Pyrazinamide 20-25 mg/kg/jour								
± Éthambutol 15-20 mg/kg/jour								

Fig. 1. Traitement de la tuberculose de l'adulte

II- Monographie de l'Isoniazide et du Pyrazinamide

1- Isoniazide (IHN OU H)¹⁰

a. Structure chimique de l'isoniazide



L'isoniazide est un dérivé de l'acide isonicotinique, actif sur les bacilles tuberculeux intra et extracellulaire. Son nom systématique : hydrazide de l'acide 4-pyridinecarboxylique = hydrazide de l'acide isonicotinique. Il a une action bactéricide sur *Mycobacterium tuberculosis*.

b. Propriétés physicochimiques

Les propriétés physicochimiques de l'INH sont résumées dans le tableau 2 :

Tableau 2 : propriétés physicochimiques de l'INH¹¹

¹⁰ Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments. Goodman & Gilman



Dénomination commune	Formule brute	Poids moléculaire g/mol	Point de fusion	pK
Isoniazide	C₆H₇N₃O	137,14	170 à 173 °C	pK1=2 ; pK2=3,6 ; pK3=10,8

L'isoniazide se présente sous forme de cristaux blancs ou incolores ou de poudre cristalline blanche. Il est inodore et s'altère lentement lorsqu'il est exposé à l'air et à la lumière. Il est très soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool, légèrement soluble dans le chloroforme et très légèrement soluble dans l'éther.

c. pharmacodynamie

L'INH présente une activité bactéricide sélective sur le BK surtout celui en voie de multiplication rapide. Il est impliqué dans l'inhibition de la biosynthèse des acides mycolitiques qui sont les constituants importants de la paroi cellulaires mycobactérienne. Comme les acides mycolitiques ne se retrouvent que dans les mycobactéries, cette action pourrait expliquer le degré élevé de sélectivité de l'activité antimicrobienne de l'INH.

d. Pharmacocinétique

- Absorption

L'INH est facilement absorbé aussi bien après administration orale que parentérale. Le pic de concentration plasmique est de 3 à 5 µg/ml et apparaît 1 à 2 heures après administration orale de doses classiques.

- Diffusion

La diffusion de l'INH est excellente du fait de la petite taille de la molécule :

- dans les liquides : pleural, céphalo-rachidien...
- dans tous les organes : foie, rein, cerveau, poumon....
- dans toutes les cellules
- dans tous les tissus fibreux entourant les zones caséeuses.

- Transformation

Est réalisée dans différents organes mais essentiellement au niveau du foie par acétylation, le dérivé acétylé est inactif. L'acétylation est variable selon chaque individu et dépend de la constitution génétique : acétylateurs rapides, acétylateurs lents.

- Elimination

Elle se fait par deux voies :

* par voie urinaire sous forme active 10 à 30% (suivant le type d'acétylateurs).

¹¹ MONOGRAPHIE RIFATER® Version s-a 4.0 datée du 11 mars 2009



* par voie biliaire sous forme métabolisée.

e. Indications thérapeutiques

L'INH reste la molécule la plus importante dans le traitement de tous types de tuberculose. Il est disponible sous forme pharmaceutique orale ou parentérale. La dose totale quotidienne est généralement de 5 mg/kg le maximum étant de 300 mg. Les doses orales et intramusculaires sont identiques. L'INH est généralement administré en une seule dose orale quotidienne.

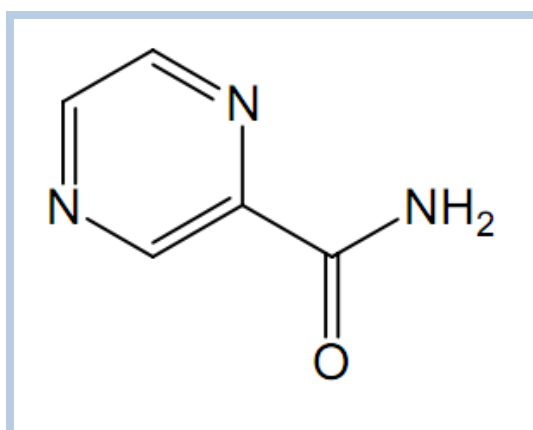
f. Effets indésirables

Ils peuvent dépendre en partie de la vitesse d'acétylation et des antécédents du malade. En général, la tolérance est bonne vu l'index thérapeutique élevé de l'INH. On peut remarquer les troubles suivants :

- Troubles digestifs : nausées, vomissements, douleurs épigastriques ;
- Troubles hépatiques : élévation relativement fréquente des transaminases : rares hépatites aiguës (avec ou sans ictère), certains pouvant être sévères.
- L'hépatotoxicité est accrue par association avec la rifampicine : par un mécanisme d'induction enzymatique.
- Troubles neurotoxiques : Neuropathies périphériques : Polynévrite avec atteinte sensitive des extrémités.

2- Pyrazinamide (PZA ou Z)^{12, 13}

a. Structure chimique du Pyrazinamide



¹² Pyrazinamide *Tuberculosis* (2008) 88(2) 141–144

¹³ Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments. Goodman & Gilman



Le Pyrazinamide est un dérivé du nicotinamide, actif sur les bacilles tuberculeux à localisation intracellulaire. Il appartient à la classe des pyrazinecarboxamide. Son nom systématique : pyrazine-2-carboxamine. Il a une action bactéricide sur les Mycobacterium Tuberculosis.

b. Propriétés physicochimiques

Les propriétés physicochimiques de la PZA sont résumées dans le tableau 3 :

Tableau 3 : propriétés physicochimiques du PZA

Dénomination commune	Formule brute	Poids moléculaire g/mol	Point de fusion	pKa
Pyrazinamide	C ₅ H ₅ N ₃ O	123.11	192°C	0,5

Le PZA se présente sous forme de poudre cristalline blanche ou presque blanche, inodore ou presque inodore, peu soluble dans l'eau et légèrement soluble dans l'alcool, l'éther et le chloroforme.

c. Pharmacodynamie

Inhibiteur spécifique de la synthèse des acides mycoliques. Le PZA est bactéricide sur les bacilles intracellulaires dits « quiescents » et sur les bacilles à métabolisme lent contenus dans le caséum.

d. Pharmacocinétique

- Absorption

Le PZA est bien adsorbé au niveau gastro-intestinal et se distribue largement dans tout le corps. L'administration orale d'une dose de 25 mg/kg par jour entraîne des concentrations plasmiqes entre 20 et 40 µl/ml après 2h. La fixation aux protéines plasmatiques est très faible.

- Diffusion

Le PZA diffuse facilement dans les tissus (poumon, foie, rein) et les macrophages.

- Transformation

Elle est effectuée par désamination au niveau du foie formant de l'acide pyrazinoïque qui lui-même est transformé par la xanthine oxydase en acide 5-hydroxypyrazinoïque.

- Elimination

L'élimination rénale concerne le PZA (4 %), l'acide pyrazinoïque (40 %) et l'acide 5-hydroxypyrazinoïque (30 %). L'élimination rénale du PZA entre en compétition avec l'acide urique. Sa demi-vie est de 4 à 10 heures.



e. Indications thérapeutiques

Le PZA est devenu un composé important de la multi-thérapie à court terme (6 mois) de la tuberculose. Il est disponible sous forme de comprimés. La dose quotidienne chez l'adulte est de 15 à 30 mg/kg par voie orale. La dose maximale à administrer est de 3g par jour quel que soit le poids.

f. Effets indésirables

Ses effets secondaires sont dominés par :

- L'hépatotoxicité qui oblige l'interruption du traitement en cas d'élévation des transaminases à 4-5 fois la normale.
- Les arthralgies et plus rarement les crises de goutte sont la conséquence de l'augmentation de l'uricémie. Celle-ci est normale au cours du traitement par la PZA et ne doit pas faire modifier le traitement ni introduire l'allopurinol. En effet, le PZA et ses métabolites sont excrétés en compétition avec l'acide urique. L'augmentation de l'acide urique est, en revanche, un bon reflet de l'observance thérapeutique. Un exanthème avec prurit est également fréquent et cède généralement sous antihistaminique.

III- L'intérêt du suivi thérapeutique de l'INH et du PZA

Le suivi thérapeutique consiste en le dosage des médicaments afin de déterminer leurs concentrations le plus souvent dans le sang, le sérum ou le plasma du malade. Le suivi thérapeutique dans le cadre du traitement de la tuberculose permet au médecin de faire un ajustement rapide de la posologie des médicaments prescrits. Les ajustements de ces doses sont recommandés dans le cas des patients présentant soit une réaction lente au traitement, soit atteints d'une tuberculose résistante aux médicaments, ou d'une maladie concomitante qui peut compliquer considérablement la situation clinique. Le suivi thérapeutique peut être également préconisé pour éviter des interactions entre les médicaments.¹⁴

a- L'intérêt du suivi thérapeutique de l'INH¹⁵

Le suivi thérapeutique de l'INH se justifie d'une part par la grande variabilité interindividuelle de sa pharmacocinétique (en particulier du fait d'un polymorphisme génétique

¹⁴ Therapeutic Drug Monitoring in the Treatment of Tuberculosis. Charles A. Peloquin. *Drugs* 2002; 62 (15): 2169-2183

¹⁵ Suivi thérapeutique pharmacologique de l'isoniazide *EMC Biologie clinique* [90-45-0155]



concernant l'acétylation hépatique de l'INH), et d'autre part par l'existence d'interactions médicamenteuses pharmacocinétiques notamment à la RIF qui est un inducteur enzymatique.

b- L'intérêt du suivi thérapeutique du Pyrazinamide

L'intérêt du suivi thérapeutique du PZA réside dans la réduction de la gravité des effets indésirables de ce principe actif ainsi que l'observance du traitement. Parmi les effets les plus fréquents et les plus sérieux du PZA, que justement le suivi thérapeutique permet de diminuer la gravité, on peut citer une atteinte hépatique liée à des doses élevées du médicament, l'apparition d'arthralgies et rarement des crises de goutte. Cette réduction est obtenue à travers l'adaptation de la dose administrée à chaque patient selon la réaction de son métabolisme.

Le dosage de la PZA et de l'INH s'effectue par plusieurs méthodes dont la spectrofluorimétrie, la polarographie... Cependant, la HPLC reste à présent la méthode la plus utilisée.^{16,17}

IV- Chromatographie liquide à haute performance^{18,19,20}

1- Principe

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une technique de séparation chromatographique reposant sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile qui est délivrée à partir d'un réservoir et circule à travers la colonne. Les principes actifs de l'échantillon séparés passent à travers le détecteur pour être identifiés. En sortie de colonne, chaque principe est quantifié par un détecteur. Ce dernier placé à la sortie peut être couplé à un enregistreur ou une unité informatique qui traduit le signal électrique en chromatogramme. En effet, le détecteur dirige sur l'enregistreur un signal constant appelé ligne de base en présence du fluide porteur ; le passage de chaque soluté séparé conduit à l'enregistrement d'un pic.

Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance.

¹⁶ Dosage de l'isoniazide, du n- acetylisoniazide et de l'acide isonicotinique par polarographie à tension sinusoidale surimposée J. J. VALLON. A. BADINAND et C. BICHON

¹⁷ Microdosage de l'isoniazide et de l'acetylisoniazide plasmatiques par chromatographie liquide à haute performance C. LACROIX*, G. LAINE et J.P. GOULLE

¹⁸ www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosart/decouv/chromato/savoirplus.html

¹⁹ Cours de chromatographie liquide. Dr Thierry BRIERE Département de Chimie Université de La Réunion

²⁰ Chromatographie liquide. Pr. Jean-Louis CUQ Université MONTPELLIER 2

L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté.

2- Appareillage

L'appareillage de l'HPLC se compose d'un système de pompage directement liée à un réservoir de solvant, d'une colonne chromatographique, d'un détecteur et d'un système d'acquisition et d'interprétation des données (intégrateur ou enregistreur ou unité informatique). La figure 2 représente un schéma simplifié d'HPLC.

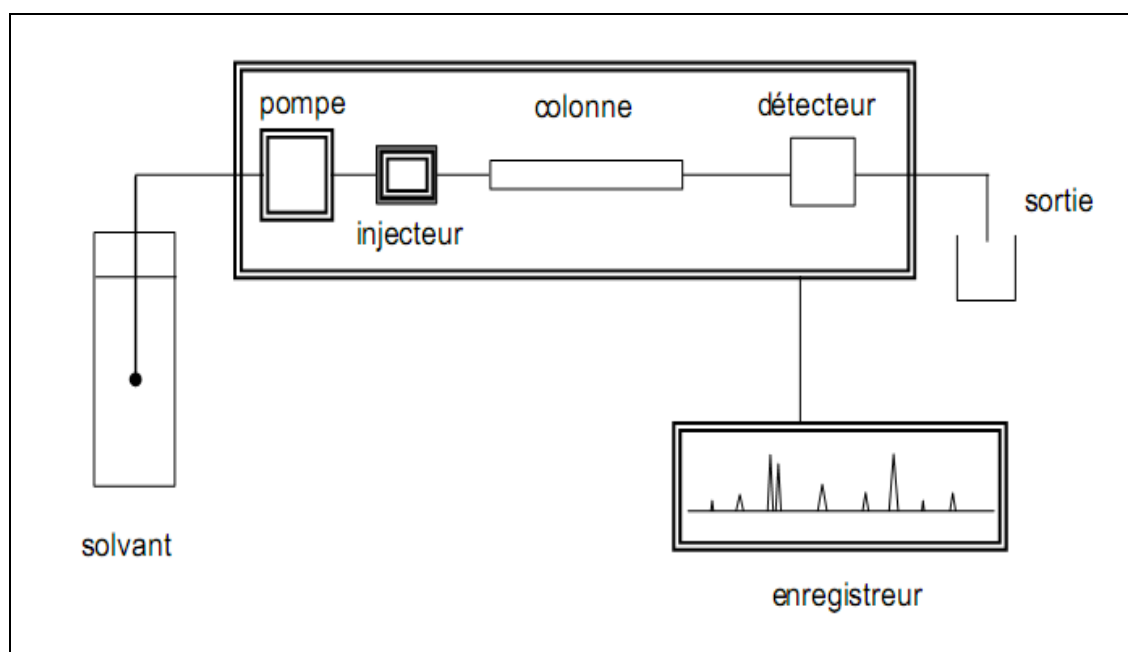


Figure 2 : schéma classique de HPLC (chromatographie liquide haute performance)

a. Système de pompage

Les systèmes de pompage de l'HPLC doivent fournir la phase mobile à un débit constant. La pompe est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler :

- En mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- En mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants. Pour les chromatographies à gradients d'éluants, il existe des systèmes de pompage qui délivrent les solvants à partir de



plusieurs réservoirs, le mélange pouvant être effectué soit en amont (basse-pression) soit en aval (haute pression) de la pompe.

➤ Phase mobile

La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui doit être de pureté analytique et filtré pour éliminer les particules solides qui risqueraient d'endommager la pompe ou de bloquer la colonne. Le filtre, en acier inoxydable d'une porosité de 2 μm , est placé à l'extrémité dans le réservoir à solvant.

b. Injecteurs

La solution à examiner est introduite dans la phase mobile circulante en tête de colonne, ou à proximité de celle-ci, à l'aide d'un système d'injection conçu pour fonctionner à pression élevée. Les injecteurs peuvent être à boucle fixe ou volume variable, à fonctionnement manuel ou pilotés par un échantillonneur automatique. Le remplissage partiel des boucles, manuellement, peut entraîner une moindre fidélité du volume injecté. Le choix du volume à se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser.

c. La colonne

La colonne est la partie active du système, c'est elle qui joue le rôle prépondérant. C'est un cylindre calibré généralement en acier inoxydable parfois doublé d'un matériau inerte (verre ou plastique spéciaux) de 5 à 30 cm de longueur et de diamètre compris entre 0,5 et 5 mm. La colonne est remplie de phase stationnaire constituée de grains sphériques calibrés.

d. Détecteurs

Ils existent plusieurs types de détecteurs on peut citer :

- UV-visible
- Spectrofluorimétrie
- Electrochimique
- Indice de réfraction
- Spectrométrie de masse

Le choix d'un détecteur dépend à la fois des caractéristiques physiques des espèces à séparer et des conditions opératoires.

Les principales caractéristiques d'un détecteur sont :

- La sensibilité (rapport de la réponse du détecteur à la quantité d'échantillon) elle varie généralement avec la nature du soluté et de la phase éluante.
- La limite de détection ; quantité minimale détectable exprimée en multiple du bruit de fond, (rapport signal sur bruit > 2) ;
- La linéarité qui exprime le domaine de concentration dans lequel la réponse du détecteur varie linéairement avec la concentration ;





- Le volume mort de la cellule du détecteur (de 1 à 10 μ l) et son temps de réponse.

e. Système d'acquisition de données : Intégrateur, enregistreur, unité informatique

Ce système d'acquisition traduit les signaux en données chromatographiques, trace les chromatogrammes et intègre la surface des pics. Il imprime un rapport d'analyse donnant les temps de rétentions et les surfaces de chaque pic.

3- Types de chromatographie liquide

Suivant la nature des analytes à séparer, diverses phases stationnaires solides peuvent être utilisées :

- Chromatographie par échange d'ions : la phase stationnaire est ionique, l'analyte ionique (ionisable) interagit avec les groupes de charges opposées de la phase stationnaire. La phase mobile est une solution aqueuse de force ionique donnée.
- Chromatographie d'exclusion : la phase stationnaire est un tamis moléculaire ; les analytes sont séparés en fonction de leur taille.
- Chromatographie de partage :
 - Phase stationnaire est polaire (mode normal) est la phase mobile est un solvant non polaire
 - Phase stationnaire est apolaire (mode inversé) est la phase mobile est un solvant polaire

Le tableau suivant résume les différents types de chromatographie :

Tableau 4 : résumé des différents types de chromatographie



phase stationnaire	principe de séparation	caractéristiques de la phase stationnaire	principe de la fixation et de l'élution
liquide	partage	liquide fixé sur un support inerte (papier, silice...)	distribution des composants du mélange à séparer dans les deux phases liquides selon leur coefficient de partage
solide	adsorption	adsorbant solide polaire	phénomène de surface : formation de liaisons spécifiques entre les composants et la surface adsorbante
	adsorption (phase inverse)	molécules hydrophobes greffées sur de la silice	interactions hydrophobes et élution par diminution de la polarité de la phase mobile
	échange d'ions	résine (polymères d'oses) porteuse de groupements chargés négativement ou positivement	interactions électrostatiques avec les composants de charge opposée
	exclusion (filtration sur gel)	solide poreux	les composants de diamètre supérieur à celui des billes du support sont "exclus" et ceux de diamètre inférieur y diffusent et sont freinés
	affinité	support sur lequel est greffée une molécule (le ligand) spécifiquement reconnue par un des composants de l'échantillon à analyser	déplacement de l'équilibre de liaison [molécule - ligand greffé] en faveur de l'équilibre [molécule - tierce molécule]

Le dosage de la PZA par HPLC se fait selon la technique utilisée pour le dosage de l'INH et de son métabolite l'acétyl-isoniazide (Ac-INH) en utilisant le nicotinamide comme standard interne²¹. Le développement de cette technique a permis d'individualiser un pic chromatographique de la Pyrazinamide qui n'interfère ni avec l'INH ni avec l'Ac-INH offrant ainsi la possibilité de le doser.

Au cours de ce travail, on a validé le dosage de la Pyrazinamide par HPLC selon la même technique décrite pour l'INH et l'Ac-INH.

I- Matériels et méthodes

²¹ Therapeutic isoniazid monitoring using a simple high performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection. L.Ait moussa, C.E.khassouani, R.Alric and all. *Journal of chromatography B*, 766 (2002) 181-187.



1- Matériels et réactifs

➤ Appareillage

- Chromatographe liquide haute performance (Merck).
- Centrifugeuse (au moins 3000t/min)
- Vortex.
- Sonificateur
- pH-mètre

➤ Matériel biologique

La gamme de calibration est préparée à partir de plasma de sujets ne prenant pas les principes actifs étudiés (provenance : centre de transfusion sanguine de Rabat)

➤ Réactifs

- Isoniazide, poudre pure
- Pyrazinamide, poudre pure
- Nicotinamide poudre pure
- Acide acétique glaciale
- Ammoniaque
- Acide trichloracétique
- Acétonitrile pour HPLC
- Eau pour HPLC

2- Description de la technique

➤ Traitement des échantillons

Dans un tube à hémolyse mettre :

- 500µl de plasma témoins ou échantillons.
- 250µl de solution de déprotéinisation.
- Agiter au vortex pendant 30 s.
- Centrifuger à 3000 t/min pendant 10 min.



- Dans un autre tube à hémolyse : diluer le surnageant au demi avec la solution acétate d'ammonium à 0.5 M, pH : 8.20.
 - Injecter 80µl.
- Conditions Chromatographiques
- Phase mobile : Solution d'acétate d'ammonium 0.05M, pH 6 : 99%
Acetonitrile : 1%
Dégazer aux ultrasons (10 min) ou à l'aide de la trompe à vide avant utilisation.
 - Débit : 1.2 ml/min (pression : 90bar).
 - Colonne : µBondapak C18.30 mm x 3,9mm, 125A
: Colonne Wakosil C18 HG, 250x 4.6.5 µm
 - Température : de la colonne : 20°C
 - Détection : UV, $\lambda=275\text{nm}$
 - Sensibilité du détecteur : 0,02 AUFS
 - Volume à injecter : 80µl.

3- Optimisation de la méthode

➤ Gamme d'étalonnage

Pour la PZA le Tmax est atteint en 2h. Après une prise de 25 mg/kg par jour, la Cmax est de 20 à 40 µg/ml, cette concentration varie selon la dose administrée. Vu que les concentrations des points de gamme de l'INH sont entre 0,5 et 8 µg/ml on a choisi des concentrations des points de gamme du PZA entre 2,5 et 40 µg/ml, le tableau suivant présente les points de gamme utilisés :

Tableau 5 : gamme d'étalonnage

Concentration INH-PZA	0	0,5-2,5	1-5	2-10	4-20	8-40
Volume solution F µl	0	25	50	100	200	400
Volume eau µl	500	475	450	300	100	100
Volume plasma µl	500	500	500	500	500	500

F = 20µl INH (1g/l) + 100µl PZA (1g/l) + 880µl eau

4- Validation d'une méthode analytique^{22,23}

²² Groupe de travail "Accréditation" de la Société Française de Toxicologie Analytique : Aide à la validation des méthodes en Toxicologie et Suivi Thérapeutique Pharmacologique

²³ validation d'une méthode analytique appliqué au dosage du médicament. S. Touratier et D. Pradeau



La validation d'une méthode analytique peut être définie comme une démarche critique visant à s'assurer de sa qualité ou validité. L'objectif de la validation n'est pas de comparer une méthode à une autre préexistante mais de mieux connaître ses caractéristiques. La validation correspond donc à une étude scientifique des critères de fiabilité de cette technique qui sont :

- Spécificité
- Linéarité
- La répétabilité
- La fidélité intermédiaire

1- Spécificité

Elle caractérise une méthode qui répond à un composé unique et qui ne présente pas d'interférence.

2- Linéarité

L'étude de la linéarité revient à une étude de régression. La méthode de la régression consiste à étudier à travers la gamme d'étalonnage la liaison et sa représentation par un modèle mathématique entre la concentration de l'analyte et la réponse instrumentale. La relation concentration réponse est exprimée par une courbe d'étalonnage dont l'équation est :

$$y = ax + b.$$

Elle peut être complétée par le calcul du coefficient de corrélation r et un facteur de réponse. En fait, la détermination du coefficient de corrélation r ne permet pas à elle seule de vérifier si la représentation concentration-réponse correspond à une droite. Son calcul n'est intéressant que pour vérifier la présence d'une liaison entre la concentration et la réponse et non pas pour définir de façon absolue la linéarité. Le facteur de réponse est le rapport réponse/concentration. Si la relation concentration/réponse dans une zone déterminée est une droite, le facteur de réponse sera constant quelles que soient les valeurs des couples concentration/réponse. A partir des résultats des facteurs de réponse calculés, on détermine la moyenne, l'écart type et le coefficient de variation (CV). Une faible valeur de ce coefficient permet d'affirmer avec quasi certitude que la représentation concentration-réponse est une droite

3- Répétabilité

L'essai de répétabilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour le même analyte dans des conditions identiques : même opérateur, même lots de réactifs, même instrument, même calibrateur. En pratique, cet essai sera réalisé au cours d'une même série. L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne ($\bar{X}$), l'écart-type

—



(s) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série. Le CV représentera la répétabilité de la méthode en %.

4- Fidélité intermédiaire (reproductibilité)

L'essai de fidélité intermédiaire consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour le même analyte dans des conditions différentes : l'opérateur, les réactifs, l'appareillage, les calibrages, les gammes d'étalonnage et les jours. Les modalités de calcul sont identiques à celles de la répétabilité, avec calcul de la moyenne ($\bar{X}$), de l'écart-type (s) et du coefficient de variation (CV); le CV ainsi calculé sera comparé au CV limite d'acceptabilité. Le CV représentera la fidélité intermédiaire de la méthode, exprimé en %.

$$\text{Moyenne} = \bar{X} = \sum X_i / n$$

$$\text{Ecart type} = s = \sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2 / (n-1)} \quad \text{avec } n \quad 1-5 \text{ ou } 1-3$$

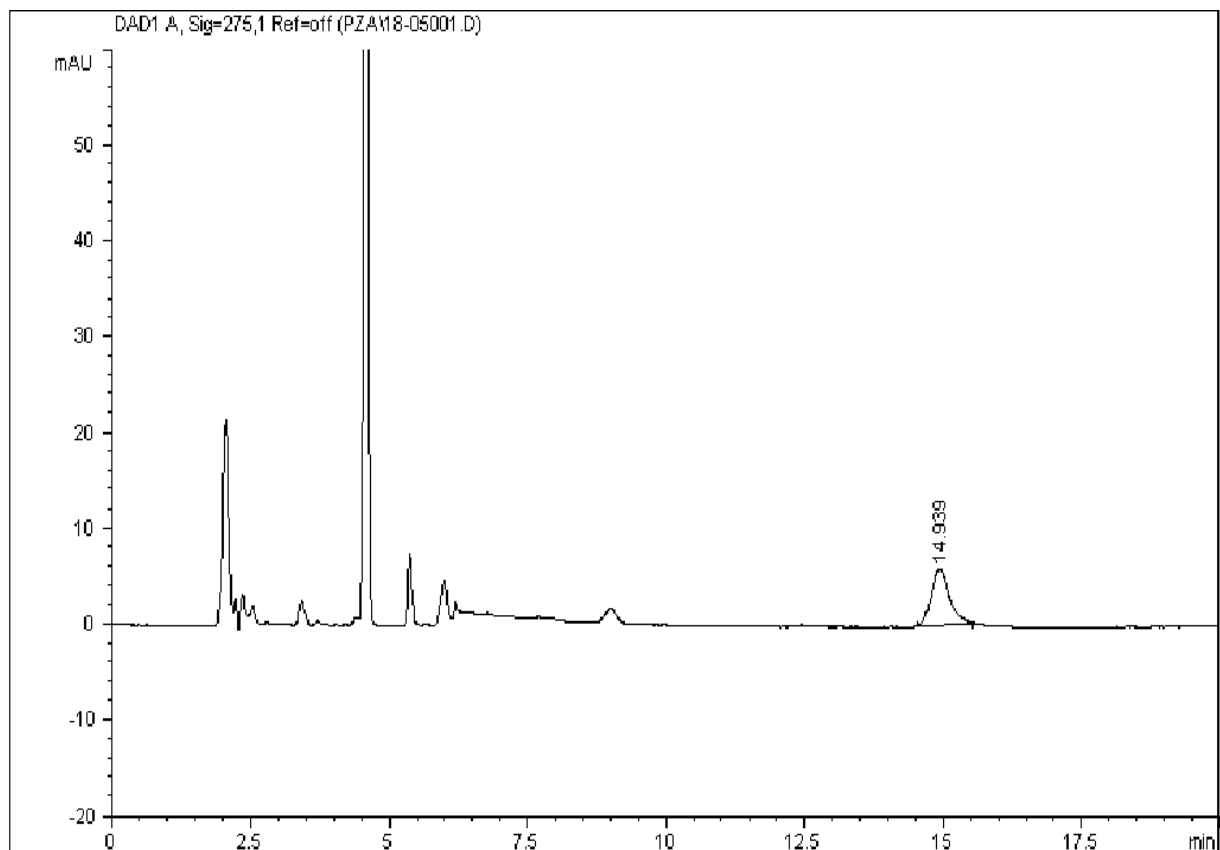
$$\text{CV} = \text{Coefficient de variation} = \left[\frac{\text{écart type}}{\text{moyenne}} \right] = s / \bar{X}$$

II- Résultats

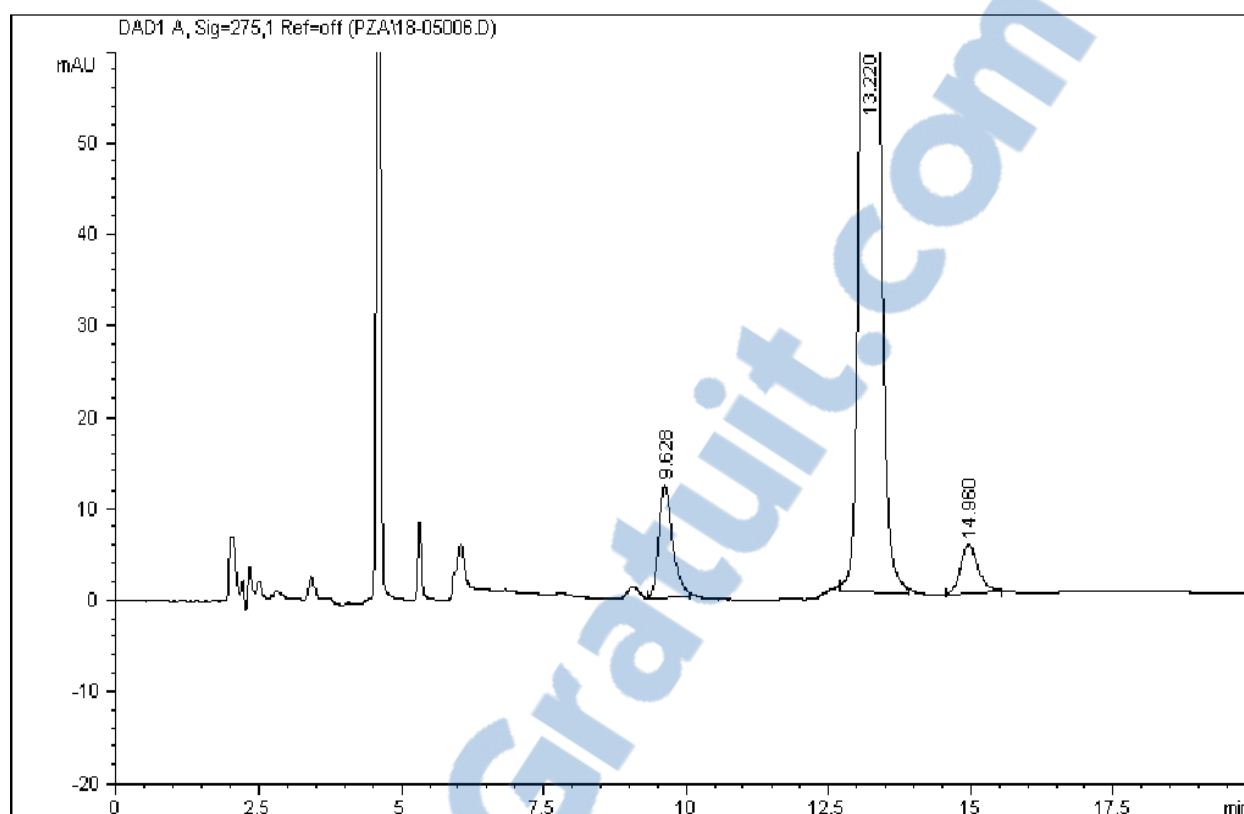
Les résultats de la linéarité, répétabilité et fidélité intermédiaire sont présentés en hauteur de l'INH et PZA par rapport à la hauteur du standard interne H/HSI.

1- Spécificité

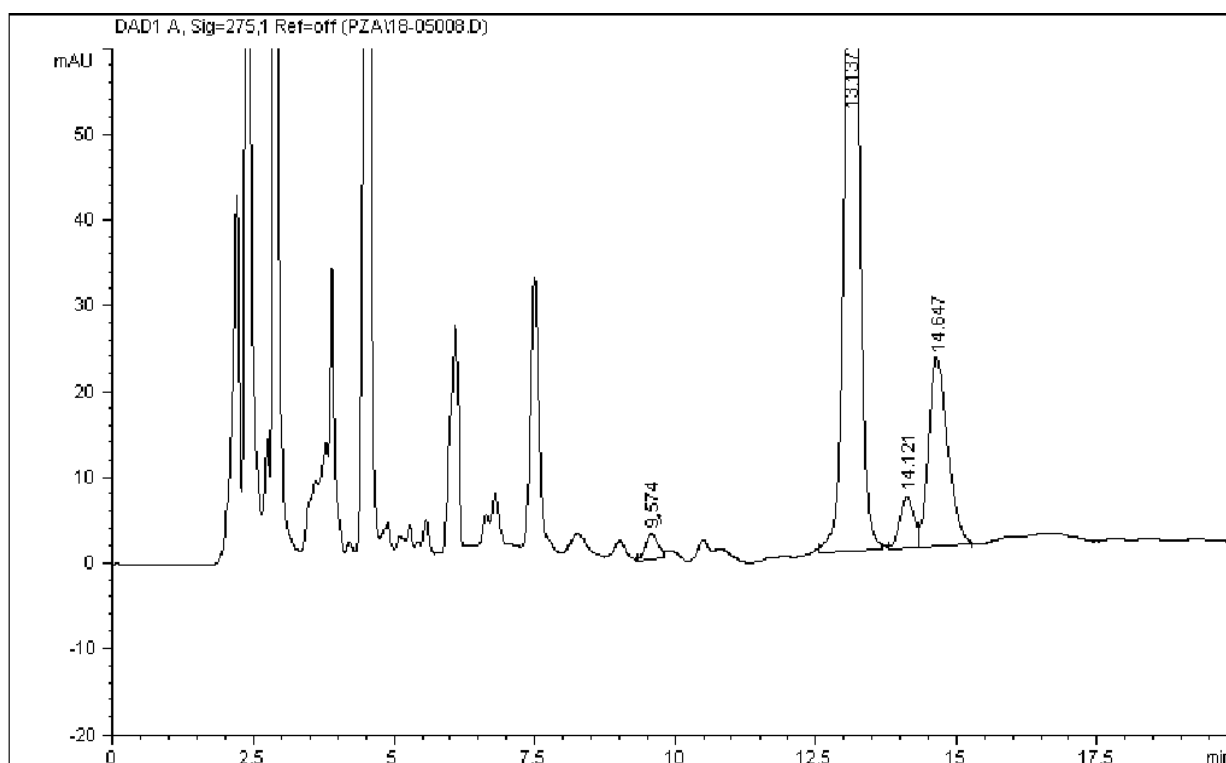
a- Chromatogramme du blanc



b- Chromatogramme d'un point de gamme



c- Chromatogramme d'un malade



2- Linéarité

Tableau 6 : Linéarité de l'INH en H/HSI

H/HSI				
concentration	Gamme 1	Gamme 2	Gamme 3	MOYENNE
0,5	0,119	0,119	0,135	0,124
1	0,234	0,206	0,257	0,232
2	0,476	0,476	0,560	0,504
4	0,915	1,034	1,079	1,009
8	1,776	2,226	2,156	2,0532
EQUATION DE LA DROITE	$y = 0,2205x + 0,0211$	$y = 0,2696x + 0,0022$	$y = 0,2841x - 0,0683$	$y = 0,2581x - 0,0151$
r	0,9996	0,9998	0,9986	0,9999

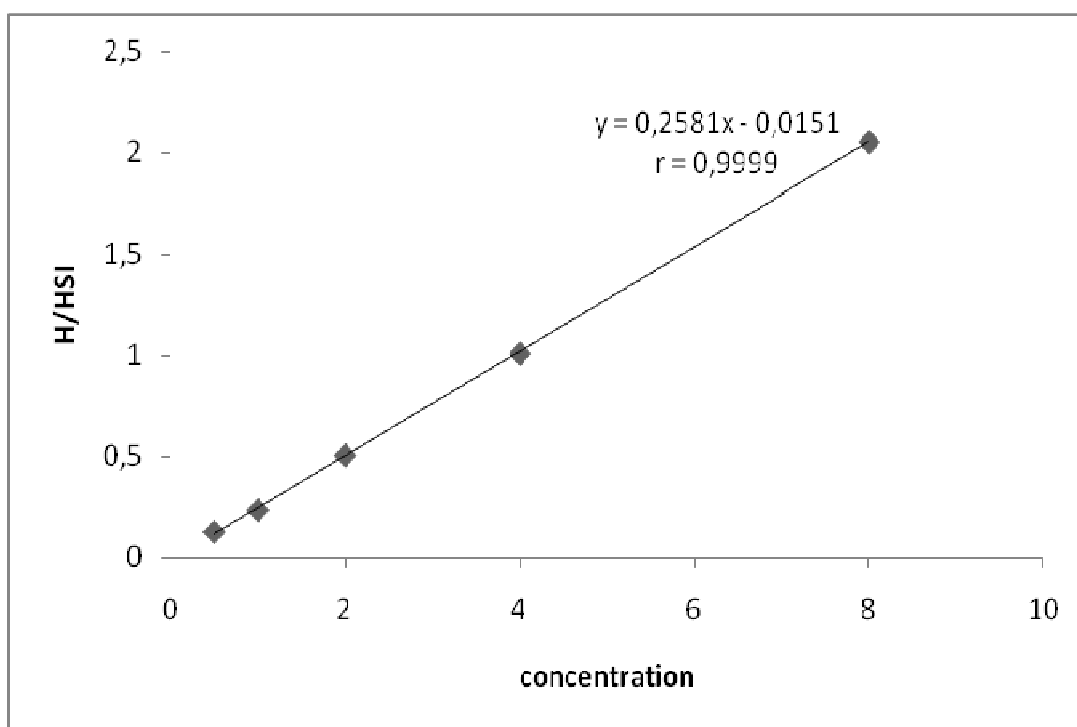


Fig. Droite de régression de l'INH moyenne H/HSI en fonction des concentrations

Tableau 7 : Facteurs de réponse pour la linéarité de l'INH

FACTEUR DE REPONSE			
CONCENTRATION	Gamme 1	Gamme 2	Gamme 3
0,5	0,239	0,270	0,238
1	0,234	0,257	0,206
2	0,238	0,280	0,238
4	0,228	0,269	0,258
8	0,222	0,269	0,278
MOYENNE	0,232	0,269	0,244





ECART TYPE	0,007	0,007	0,026
CV	3,081	2,914	10,981

Tableau 8 : linéarité de l’PZA en H/HSI

H/HSI				
concentration	Gamme 1	Gamme 2	Gamme 3	MOYENNE
2,5	1,531	1,842	1,905	1,759
5	3,132	3,286	3,539	3,319
10	6,555	7,621	8,305	7,494
20	12,601	14,475	17,656	14,911
40	24,336	28,570	36,854	29,920
EQUATION DE LA DROITE	$y = 0,6066x + 0,2299$	$y = 0,7148x + 0,0803$	$y = 0,9406x - 0,9275$	$y = 0,754x - 0,2058$
r	0,9996	0,9998	0,9986	0,9999

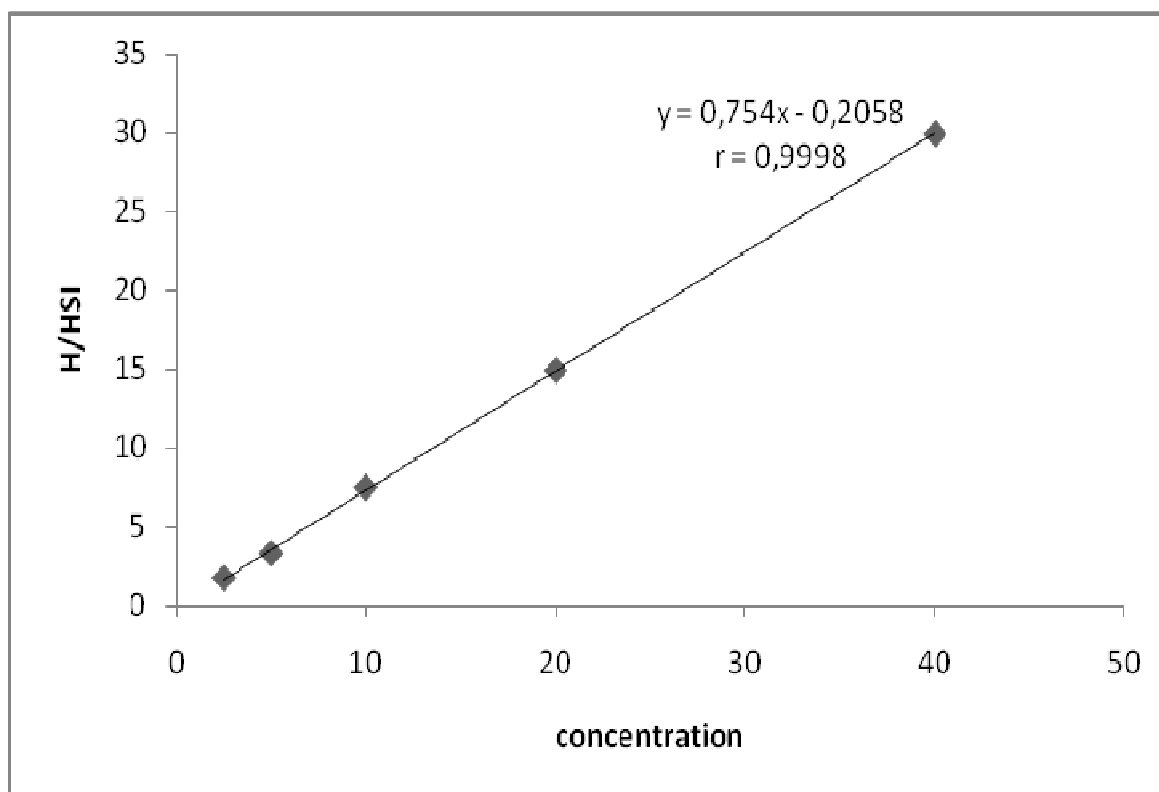


Fig. Droite de régression du PZA moyenne H/HSI en fonction des concentrations

Tableau 9 : Résultats des facteurs de réponse du PZA

FACTEUR DE REPONSE			
CONCENTRATION	Gamme 1	Gamme 2	Gamme 3
2,5	0,612	0,736	0,762
5	0,626	0,657	0,707
10	0,655	0,762	0,830
20	0,630	0,723	0,882
40	0,608	0,714	0,921
MOYENNE	0,626	0,718	0,820
ECART TYPE	0,018	0,038	0,086
CV	2,963	5,399	10,597



3- Répétabilité

Tableau 10 : Répétabilité de l'INH exprimée en H/HSI

H/HSI						
concentration	Gamme 1	Gamme 2	Gamme 3	MOYENNE	ECART TYPE	CV
0,5	0,087	0,115	0,110	0,104	0,015	14,626
2	0,466	0,449	0,425	0,446	0,020	4,676
8	1,846	1,694	1,833	1,791	0,083	4,688

Tableau 11 : Répétabilité du PZA exprimée en H/HSI

H/HSI						
concentration	Gamme 1	Gamme 2	Gamme 3	MOYENNE	ECART TYPE	CV
2,5	1,956	1,680	1,935	1,857	0,153	8,272
10	9,456	9,188	8,491	9,045	0,498	5,506
40	36,506	37,625	35,748	36,627	0,944	2,578

4- La fidélité intermédiaire

Tableau 12 Résultats de fidélité intermédiaire de l'INH

H/HSI						
concentration	Gamme 1	Gamme 2	Gamme 3	MOYENNE	ECART TYPE	CV
0,5	0,135	0,119	0,142	0,132	0,011	9,022
1	0,257	0,206	0,227	0,230	0,026	11,289
2	0,560	0,476	0,432	0,489	0,064	13,213
4	1,079	1,034	1,067	1,060	0,023	2,216
8	2,156	2,225	1,726	2,036	0,270	13,290



Tableau 13 : Résultats de fidélité intermédiaire du PZA

H/HSI						
concentration	Gamme 1	Gamme 2	Gamme 3	MOYENNE	ECART TYPE	CV
2,5	1,842	1,905	1,362	1,703	0,297	17,440
5	3,286	3,539	3,861	3,562	0,288	8,084
10	7,621	8,305	8,412	8,113	0,429	5,290
20	14,475	17,656	18,327	16,820	2,057	12,232
40	28,534	36,854	29,401	31,596	4,573	14,476

III- Discussion

1- Spécificité

Le chromatogramme du point de gamme représente les pics de l'INH et du PZA ainsi que celui du standard interne avec des temps de rétention respectivement : 9,628 ; 13,220 ; 14,960. Les pics sont bien séparés et ne représentent pas d'interférences. Le chromatogramme du blanc ne présente aucun pic qui pourra interférer avec ceux du PZA et de l'INH. Le chromatogramme du malade ne présente pas aussi d'interférences au niveau des pics du PZA et de l'INH, par contre au niveau du pic du standard interne on remarque une interférence, cela est peut-être dû au fait que le patient prends une autre substance qui a le même temps de rétention que le standard interne.

2- Linéarité

Pour les deux molécules l'INH et le PZA la linéarité de la méthode est obtenue respectivement entre 0,5-8 et 2,5-40 µg/ml, les courbes d'étalonnage représentent des droites dont les coefficients de corrélations varient entre 0,9986 et 0,9999 ; les coefficients de variation des facteurs de réponse sont faible confirmant que les présentations concentrations-H/HSI pour les deux molécules sont des droites.

3- La répétabilité

La répétabilité faite sur la même solution de l'isoniazide et du Pyrazinamide dans des conditions identiques a été exprimée en rapport H/HSI. Les coefficients de variation des rapports H/HSI obtenus varient entre 4,688 et 14,626 pour l'IHN et entre 2,578 et 8,272 pour le PZA, ces valeurs sont inférieures à 15% confirmant que la méthode est répétable.

4- La fidélité intermédiaire

Les valeurs de ces coefficients obtenus à partir des analyses faites sur la même solution de l'isoniazide et du Pyrazinamide dans des jours différents varient entre 2,216 et 13,290 pour l'INH et entre 5,290 et 17,440 pour le PZA.



Afin que la fidélité intermédiaire soit atteinte, les coefficients de variation doivent être inférieurs à 15, puisque l'HPLC est une méthode fiable et précise on peut accepter des valeurs allant jusqu'à 20. De ce fait la fidélité intermédiaire est démontrée.



Conclusion

Dans le but de raccourcir la durée et d'améliorer l'efficacité des traitements de certaines maladies et de réduire leurs coûts, le laboratoire du CAPM ne cesse de chercher de nouvelles techniques et d'améliorer celles préexistantes. C'est dans ce sens que ce travail s'est porté sur la technique du dosage de l'INH afin de l'enrichir.

L'apport de ce travail consistait à valider la technique du dosage du PZA et de l'INH par chromatographie liquide à haute performance. Ce dosage a pour but de rendre le traitement plus efficace en diminuant de la gravité des effets indésirables de ces médicaments et aussi pour une meilleure adaptation de la dose administrer. Les résultats obtenus que ce soit pour la linéarité, la répétabilité, la fidélité intermédiaire ainsi que pour la spécificité confirme cette validité. La méthode est donc fiable et applicable aux malades.

Toute fois, il est important de signaler l'intérêt de ce stage vu qu'il m'a permis d'approfondir mes connaissances scientifiques, d'appliquer la théorie déjà acquise au cours de ma formation et d'avoir un contact enrichissant avec le milieu socioprofessionnel.