

UNIVERSITE DE LUBUMBASHI

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

Département de Galénique et Analyse des Médicaments

B.P. 1825

Lubumbashi



**ETUDE DE LA FALSIFICATION DE MEDICAMENTS
ET MISE AU POINT DE METHODES ANALYTIQUES
POUR DETECTER LES ANTIBIOTIQUES DE
QUALITE INFERIEURE**

Pierrot MWAMBA TSHILUMBA

Pharmacien

Diplômé d'Etudes Approfondies en Sciences Pharmaceutiques

Thèse présentée en vue de l'obtention du titre de
Docteur en Sciences Pharmaceutiques

Option : Industrie et Analyse des Médicaments

Année académique : 2020 - 2021

UNIVERSITE DE LUBUMBASHI

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

Département de Galénique et Analyse des Médicaments

B.P. 1825

Lubumbashi



**ETUDE DE LA FALSIFICATION DE MEDICAMENTS
ET MISE AU POINT DE METHODES ANALYTIQUES
POUR DETECTER LES ANTIBIOTIQUES DE
QUALITE INFERIEURE**

Pierrot MWAMBA TSHILUMBA

Pharmacien

Diplômé d'Etudes Approfondies en Sciences Pharmaceutiques

Thèse présentée en vue de l'obtention du titre de
Docteur en Sciences Pharmaceutiques

Option : Industrie et Analyse des Médicaments

Promoteur : **Professeur Jean-Baptiste KALONJI NDOUMBA** (UNILU)

Co-promoteur : **Professeur Pierre DUEZ** (UMONS)

Année académique : 2020 – 2021

DEDICACE

A Michaël, Gabrielle et Raphaëlle...

AVANT PROPOS

Au terme de ces cinq années de Doctorat et à l'aube de ce manuscrit, je souhaite remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

J'adresse mes premiers remerciements au Professeur Jean-Baptiste KALONJI, Promoteur de cette thèse. Professeur, ces quelques mots ne suffiront pas à exprimer tout ce que je vous dois, et notamment le choix d'un sujet me permettant de faire un travail si passionnant au quotidien. Merci pour vos conseils et orientations ayant permis l'aboutissement de ce travail.

Je désire également remercier le Professeur Pierre DUEZ, Co-promoteur de cette thèse. Professeur, depuis le début de cette étude, j'ai été bénéficiaire d'un indéfectible soutien de votre part. Merci pour ces innombrables pistes de réflexion et corrections proposées avec une patience et une modestie incroyables venant d'un si grand homme.

Je remercie vivement le Professeur Roland MARINI, pour avoir donné une dimension si intéressante à cette thèse de Doctorat et m'avoir fait découvrir le monde de la chimie analytique, particulièrement le domaine de l'analyse des médicaments... et ce fut la révélation.

J'adresse mes vifs remerciements au Professeur KAHUMBA BYANGA, qui m'a accompagné et conseillé tout au long de cette thèse de Doctorat. Mes chaleureux remerciements s'adressent également au Professeur LUMBU SIMBI Jean-Baptiste, pour ses observations ayant permis d'améliorer ce travail.

Je remercie le Professeur Salvius BAKARI pour ses conseils et orientations bénéficiés au cours de la réalisation de ce travail. Je remercie également le Professeur MUDIMBI KALONDA pour ses encouragements ayant permis l'aboutissement de ce travail.

Je souhaite remercier également Mesdames et Messieurs les membres du jury qui me font l'honneur de juger ce travail.

Je remercie chaleureusement le Professeur Philippe HUBERT de m'avoir accueilli au sein de son Laboratoire de Chimie Analytique Pharmaceutique de l'Université de Liège. Je remercie également le Professeur BLANKERT d'avoir accepté de réaliser une partie de mes expérimentations dans son Laboratoire d'Analyse Pharmaceutique de l'Université de Mons.

J'adresse mes sincères remerciements aux autorités de l'Université de Lubumbashi : le Recteur KISHIBA FITULA et le Secrétaire Général Académique, le Professeur LUNDA ILUNGA pour les efforts qu'ils ne cessent de fournir pour la relève académique de mon Université.

Cette thèse n'aurait pas pu être réalisée sans les moyens financiers et matériels. Sur ce, je remercie vivement l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur (ARES) qui a financé ce travail et par cette même occasion je remercie tous les responsables du programme ARES-P4 notamment les Professeurs NKUKU, KYUNGU, TWITE et KAMPEMBA.

J'adresse mes chaleureux remerciements à tous les membres des Laboratoires de Chimie Thérapeutique et Pharmacognosie de l'Université de Mons, de Chimie Analytique Pharmaceutique de l'Université de Liège et de Galénique et Analyse des médicaments de l'Université de Lubumbashi : Amandine, Claudio, Julie, Rania, Mussa, Pierre-Yves, ANGE ILANGALA, Patient CIZA, Christelle WAFFO, Maguy BORIVE, Alex IMPELE, Elie RONGORONGO, Isaac MUTSHITSHI, , Aty KALUMBA, Cédric MUTOMBO, Benjamin NGOLO, Adama TRAORE, pour leur contribution à une ambiance

exceptionnelle, chaleureuse et détendue qui m'a été d'une très grande aide !

Je dis merci aux couples : Maître Jacques MPOYI, Marcel Mukeba, Francis KABEYA, Richard BUKONGO, Théo Thiaba, Hermann KABAMBAA, Herve BIHINI, Stephane KAZADI, Martin KABANTU pour leur encouragement et conseils tout au long de cette étude.

Mes remerciements s'adressent également à : Da Théthé MBUYI, Da Charlotte MBOMBO, Jina, Jeanine MUJINGA Ingénieur Erwin, Maître Elie, Harold, Trésor, Tabitha, Priscilla, Quincy, Christevie, Yasmine, Emma, Ruth et Graciella pour leur encouragement.

J'adresse un très grand merci à mes parents Daniel TSHILUMBA et Mado NGOIE, qui depuis toujours m'encouragent dans mes études.

Mon dernier « merci » est un merci inestimable à Pétronille. Mon amour, merci pour ta compréhension et patience face à ces durs moments ainsi que pour ton soutien indéfectible. Le fait de savoir que tu es là pour moi et nos trois Anges (Michaël, Gabrielle et Raphaëlle) m'a communiqué une énergie folle qui m'a permis de tenir bon et d'affronter le sprint final de cet incroyable parcours.

Pharmacien Pierrot MWAMBA TSHILUMBA

RÉSUMÉ DE LA THESE

La circulation de médicaments falsifiés et de qualité inférieure (FQI) continue à connaître une ascension inquiétante. Cette étude vise à contribuer à la lutte contre la consommation des antibiotiques FQI, en mettant au point de nouveaux outils analytiques performants, adéquats et simples. Ce travail poursuit les objectifs suivants : (i) identifier les antibiotiques utilisés à Lubumbashi (ii) rechercher dans la littérature de méthodes d'analyse utilisées dans la détection des antibiotiques FQI (iii) développer de méthodes d'analyse simples, adéquates et performantes pour ensuite les valider (iv) appliquer ces méthodes développées et validées aux échantillons prélevés à Lubumbashi et (v) appliquer les méthodes de pharmacotechnie et physiques aux échantillons prélevés ci-dessus.

Une étude descriptive transversale avec récolte rétrospective des données a permis de sélectionner six antibiotiques (azithromycine, céfadroxil, céfixime, chloramphénicol, érythromycine et tétracycline) les plus utilisés localement. La chromatographie liquide à haute performance et la spectrophotométrie UV visible ont été les méthodes analytiques prises en compte. Une revue bibliographique systématique relative aux méthodes de détection des antibiotiques FQI a permis de constater que celles-ci doivent être diversifiées, actualisées et performées. Ceci nous a motivé d'entamer la mise au point de méthodes d'analyse qui s'est réalisée en trois phases : développement, validation et application.

La phase de développement a eu pour objectif de trouver des conditions analytiques appropriées pour analyser les analytes étudiés. La validation de méthodes développées a été effectuée selon l'approche de l'erreur totale utilisant le profil d'exactitude comme outil décisionnel. L'application a consisté à se servir de méthodes développées et validées pour analyser les échantillons étudiés.

Les méthodes d'analyse développées de l'azithromycine, céfadroxil, érythromycine et tétracycline sont valides. En revanche pour le céfixime, aucun intervalle de dosage n'a été valide. L'application de méthodes développées et validées aux échantillons d'antibiotiques prélevés (n=112) a montré que 21 % des échantillons ont été sous-standards.

A l'issue de cette étude, six nouvelles méthodes d'analyse ont été développées et cinq d'entre-elles validées. L'utilisation en routine de ces méthodes permettra de renforcer les laboratoires de contrôle qualité et garantir la qualité des antibiotiques que la population congolaise consomme.

Mots clés : Antibiotiques, falsification, HPLC, spectrophotométrie UV-Visible

THESIS SUMMARY

Substandard and falsified (SF) medicines continuous to pose serious menace to Public Health worldwide. This present thesis aims to contribute to the fight against the proliferation of substandard and falsified medicines, by developing new high-performance, adequate and simple analytical tools. This work aims to : (i) identify the most antibiotics used in Lubumbashi (ii) search in the literature analytical methods used in the detection of SF antibiotics (iii) develop simple, adequate and efficient analysis methods and then validate them (iv) apply these developed and validated methods to the samples collected in Lubumbashi and (v) apply the pharmacotechnical and physical methods to the samples collected

A cross-sectional descriptive study with retrospective data collection allowed the selection of six antibiotics (azithromycin, cefadroxyl, cefixime, chloramphenicol, erythromycin and tetracycline) most commonly used locally. High Performance Liquid Chromatography and UV-Vis spectrophotometry were analytical methods, which has been taken into account. A systematic review carried out in relation to these techniques, shown that method detection of SF antibiotics should be diversified and updated in order to face this health scourge. This motivated us to begin the development of analytical methods which was carried out in three phases: development, validation and application.

The objective of the development phase was to find suitable analytical conditions to analyze the active ingredient studied. The validation methods was performed using the total error approach using the accuracy profile as a decision tool. The application consisted to use developed and validated methods to analyze the samples studied.

The analytical methods developed for azithromycin, cefadroxil, erythromycin and tetracycline are valid. In contrast, for cefixime, no dosing interval has been valid. Application of developed and validated methods to the collected antibiotic samples (n = 112) showed that 21% of the samples were substandard.

Thus, six new analytical methods were developed and five of them validated. Routine use of these methods will strengthen quality control in laboratories and guarantee the quality of the antibiotics that the congolese population consumes.

Keywords: Substandard/falsified, Antibiotics, HPLC, UV/vis spectrophotometry

LISTE DES ABREVIATIONS

Les abréviations utilisées dans ce travail sont listées ci-dessous.

A	
ACT	Artemisin Combinaison Therapy
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AQbD	Analytical Quality by Design
ARP	Autorité de Réglementation Pharmaceutique
ATP	Analytical Target Profil
AV	Acceptance Value
AZT	Azithromycine
B	
BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication
BPL	Bonnes Pratiques de Laboratoire
C	
CFDM	Circuit Formel de Distribution des Médicaments
CFX	Céfixime
CHL	Chloramphénicol
CIDM	Circuit Informel de Distribution des Médicaments
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CNOP	Conseil National de l'Ordre des Pharmaciens
D	
DAD	Diode Array Detector
DCI	Dénomination Commune Internationale
DEA	Diplôme d'Etudes Approfondies
DoE	Design of Experiments
DS	Design Space
E	
EMA	European Medicines Agency
ERH	Erythromycine
EVG	Etablissement de Vente en Gros
F	
FDA	Food Drug Administration
FQI	Falsifiés et de Qualité Inférieure
GAL	Galénique
H	
HGR	Hôpital Général de Référence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I	
ICH	International Conference on Harmonization
INJ	Injectable

INTERPOL	International Criminel Police Organization
IRACM	Institut international de recherche anti-contrefaçon de médicaments
ISO	International Organisation for Standardization
L	
LAP	Laboratoire d'Analyse Pharmaceutique
LC	Liquid Chromtography
LCAP	Laboratoire de Chimie Analytique Pharmaceutique
LCTP	Laboratoire de Chimie Thérapeutique et de Pharmacognosie
LGAM	Laboratoire de Galénique et d'Analyse des M2dicaments
M	
MDR	Multiple Drug Resistance
Med Int	Médecine Interne
O	
OCC	Office Congolais de Contrôle
ORL	Oto-rhino-laryngologie
P	
PBP	Penicillin Binding Proteins
PED.	Pédiatrie
PIR	Proche Infra-Rouge
PLP	Pénicilline Liant les Protéines
PNAM	Programme National d'Approvisionnement en Médicaments Essentiels
PTFE	Polytetrafluoroéthylène
Q	
QbD	Quality by Design
QbT	Quality by Testing
R	
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
SC	Standard de calibration
SDR	Specific Drug Resistance
SNC	Système Nerveux Central
SNCC	Société National de Chemin de fer au Congo
SST	System Suitability Test
SV	Standard de Validation
T	
TRC	Tétracycline
U	
USP	United State Pharmacopeia

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Illustrations de la vente de médicaments dans de mauvaises conditions de conservation (Mwamba, 2017).	7
Figure 2. Carte administrative des 26 provinces de la RDC et échanges frontaliers potentiels (PNAM, 2008).....	10
Figure 3. Exemple d'un profil d'exactitude (Bouadibi, 2014)	26
Figure 4. Appareil de dureté du Laboratoire de Galénique et Analyse des médicaments de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques/Université de Lubumbashi. (Nom de la marque : Distek-DF-2F ; Fabricant : Distek, Inc., Ville : North Brunswick, pays : Etats-Unis (Photo Mwamba).	29
Figure 5. Appareil de friabilité du Laboratoire de Galénique et Analyse des médicaments de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques/Université de Lubumbashi. (Nom de la marque : Distek-DF-2F ; Fabricant : Distek, Inc., Ville : North Brunswick, pays : Etats-Unis (Photo Mwamba).	30
Figure 6. Appareil de désagrégation du Laboratoire de Galénique et Analyse des médicaments de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques/Université de Lubumbashi. (Nom de la marque : Distek-DF-2F ; Fabricant : Distek, Inc., Ville : North Brunswick, pays : Etats-Unis).	31
Figure 7. Appareil de dissolution du Laboratoire de Galénique et Analyse des médicaments de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques/Université de Lubumbashi. (Nom de la marque : Distek-25001 ; Fabricant : Distek, Inc., Ville : North Brunswick, pays : Etats-Unis (Photo Mwamba).	33
Figure 8. Droite de régression pour le dosage de chloramphénicol par spectrophotométrie UV-Vis	83
Figure 9. Droite de régression pour le dosage de tétracycline par spectrophotométrie UV-vis	84
Figure 10. Droite de régression pour le dosage d'érythromycine par spectrophotométrie UV-Vis	84
Figure 11. Droite de régression pour le dosage de l'échantillon CFX001 par spectrophotométrie UV-Vis en utilisant la méthode des ajouts dosés.	86
Figure 12. Répartition des cas selon pathologies infectieuses	99
Figure 13. Organigramme de la sélection des échantillons étudiés	111
Figure 14. Répartition des échantillons collectés selon les pays de provenance	112

Figure 15. Illustrations des irrégularités observées sur l’emballage des échantillons de céfadroxil	116
Figure 17. Chromatogrammes et spectres UV obtenus de a : de l’azithromycine ; b : de l’érythromycine ; c : spectre UV de l’azithromycine ; d : spectre UV de l’érythromycine... 134	134
Figure 18. Chromatogrammes obtenus de céfadroxyl et chloramphénicol avec un débit de 0.4 mL/min (temps d’analyse 60 min)	136
Figure 19. (a) Chromatogramme de céfadroxyl et chloramphénicol ayant un débit de 1ml/min (temps d’analyse 25 minutes) ; (b) : spectre UV de chloramphénicol ; (c) : spectre UV de céfadroxil.....	137
Figure 20. La sélectivité des méthodes: a) matrice céfadroxyl ; b) blanc cefadroxyl; c) standard céfadroxyl; d) céfadroxyl+matrice; e) matrice azithromycin; f) blanc azithromycine; g) standard azithromycine; h) azithromycine+matrix	140
Figure 21. Spécificité de la méthode d’analyse de l’azithromycine par rapport à ses impuretés. A : Impuretés de l’azithromycine ; B : mélange azithromycine et impuretés.....	141
Figure 23. Profils d’exactitude de l’azithromycine et céfadroxil.....	144
Figure 25. Comparaison des résultats de l’azithromycine en Suspension buvable obtenus par les méthodes validée et officielle HPLC à partir de la regression de Deming.....	150
Figure 26. Comparaison des résultats de céfadroxil en Suspension buvable obtenus par les méthodes validée et officielle HPLC à partir de la regression de Deming	150
Figure 27. Profils d’exactitude de : tétracycline, céfixime et érythromycine	158
Figure 28. Profils de linéarité de tétracycline et de l’érythromycine	160
Figure 30. Comparaison des résultats obtenus de céfixime entre les méthodes Spectro UV-VIS et HPLC à partir de la regression de Deming.....	164
Figure 32. Comparaison des résultats obtenus de l’érythromycine entre les méthodes validée et officielle à partir de la regression de Deming	165
Figure 33. Interconnexion des échantillons en fonction de leur site de collecte et conformité	168
Figure 34. Illustration de l’échantillon ayant echoué à l’essai de désagrégation.....	175

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Les indicateurs en RDC	9
Tableau II. Activités réalisées et structures d'accueil	49
Tableau III. Informations relatives aux standards utilisés.....	51
Tableau IV. Ecart limites en pourcentage de la moyenne admise pour mesurer l'uniformité de masse des comprimés et gélules.....	70
Tableau V. Spécifications relatives au temps de désintégration des formes galéniques.....	72
Tableau VI. Conditions chromatographiques appliquées au dosage de l'azithromycine et de l'érythromycine	74
Tableau VII. Conditions chromatographiques appliquées au dosage de céfadroxyl et chloramphénicol	76
Tableau VIII. Conditions chromatographiques pour l'azithromycine, le céfadroxil, le céfixime et érythromycine selon la Pharmacopée Américaine	80
Tableau IX. Dilution des étalons pour tracer la droite de régression de chloramphénicol	83
Tableau X. Dilution des étalons pour tracer la droite de régression de tétracycline	83
Tableau XI. Dilutions des étalons pour tracer la droite de régression d'érythromycine.....	84
Tableau XII. Dilution des étalons et échantillon de céfixime (CFX001) pour tracer la droite de régression	86
Tableau XIII. Valeurs de la pente, ordonnée à l'origine et coefficient de détermination des échantillons de céfixime.....	87
Tableau XIV. Prise d'essai par échantillon en fonction de la teneur déclarée en tétracycline et de la masse moyenne des gélules	88
Tableau XV. Prise d'essai par échantillon en fonction de la teneur déclarée en chloramphénicol et de la masse moyenne des gélules	88
Tableau XVII. Prise d'essai par échantillon liquide en fonction de la teneur déclarée en céfixime	89
Tableau XVIII. Prise d'essai par échantillon solide en fonction de la teneur déclarée en érythromycine et de la masse moyenne	90
Tableau XIX. Prise d'essai par échantillon liquide en fonction de la teneur déclarée en érythromycine.....	90
Tableau XX. Caractéristiques des antibiotiques utilisés en monothérapie en fonction des maladies infectieuses diagnostiquées et des formes galéniques.....	95

Tableau XXI. Nombre d'antibiotique prescrit en monothérapie selon la catégorie d'âge en pédiatrie.....	98
Tableau XXII. Nombre d'antibiotique prescrit en monothérapie selon la catégorie d'âge en médecine interne	99
Tableau XXIII. Informations relatives aux échantillons collectés.....	103
Tableau XXIV. Caractéristiques des méthodes basées sur la HPLC et spectrophotométrie UV visible	124
Tableau XXV. Mode d'élution gradient appliqué dans la phase de développement d'azithromycine et d'érythromycine	132
Tableau XXVI. Paramètres chromatographiques d'évaluation retenus de la méthode d'analyse de l'azithromycine et de l'érythromycine	133
Tableau XXVII. Conditions chromatographiques finales d'analyse de l'azithromycine et de l'érythromycine : Mode d'élution isocratique.....	135
Tableau XXVIII. mode d'élution gradient appliqué dans la phase de développement de céfadroxyl et chloramphénicol (temps d'analyse 60 minutes).....	135
Tableau XXIX. Paramètres chromatographiques d'évaluation de la méthode de céfadroxyl et du chloramphénicol	136
Tableau XXX. Mode d'élution gradient appliqué dans la phase de développement de céfadroxyl et chloramphénicol (temps d'analyse 25 minutes).....	137
Tableau XXXI. Conditions chromatographiques de céfadroxyl et chloramphénicol : mode isocratique	138
Tableau XXXII. Les justesses des méthodes de l'azithromycine et du céfadroxil	145
Tableau XXXIII. La fidélité des méthodes de l'azithromycine et du céfadroxyl	146
Tableau XXXIV. Résultats de dosage des échantillons à base d'azithromycine et céfadroxil	147
Tableau XXXV. Comparaison des résultats de dosage des Suspensions buvables entre les méthodes validées et référentielles.....	149
Tableau XXXVI. Réponses analytiques en fonction du milieu, de la longueur d'onde et de la concentration	151
Tableau XXXVII : Comparaison des moyennes des absorbances entre les solutions sans et avec matrice.....	155
Tableau XXXVIII. Justesse de méthode d'érythromycine, céfixime et tétracycline.....	155
Tableau XXXIX. La fidélité de la méthode d'érythromycine, céfixime et tétracycline	156

Tableau XL. Résultats de dosage des échantillons à base de chloramphénicol, érythromycine et tétracycline obtenus par spectrophotométrie UV-Vis	162
Tableau XLI. Résultats de dosage des échantillons de céfixime en utilisant la méthode des ajouts-dosés	163
Tableau XLII. Comparaison des résultats de dosage des suspension de l'érythromycine entre la méthode validée et officielle	164
Tableau XLIII. Conformité des échantillons en fonction du site de collecte.....	167
Tableau XLIV. Résultats de l'uniformité de masse et test de variation de masse	169
Tableau XLV. Résultats de test de friabilité	172
Tableau XLVI. Résultats de test de dureté.....	172
Tableau XLVII. Résultats de désintégration des comprimés	174
Tableau XLVIII. Résultats de pH et volume à reconstituer des suspensions buvables	176

SOMMAIRE

DEDICACE.....	I
AVANT PROPOS.....	II
RÉSUMÉ DE LA THESE.....	VI
THESIS SUMMARY.....	VIII
LISTE DES ABREVIATIONS.....	X
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
SOMMAIRE.....	XVII
INTRODUCTION.....	1
I ^{ère} PARTIE : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	4
CHAPITRE I. FALSIFICATION DE MEDICAMENTS.....	4
I.1. DEFINITIONS.....	4
I.1.1. Médicament contrefait.....	4
I.1.2. Médicament falsifié.....	5
I.1.3. Médicament sous-standard.....	6
I.1.4. Médicament non enregistré.....	6
I.1.5. Médicament dégradé.....	6
I.2. ETAT DES LIEUX.....	7
I.2.1. Situation de la falsification des médicaments en RDC.....	9
I.2.2. Quelques études de la falsification menées en RDC.....	11
I.2.3. Faiblesses du système de santé en RDC.....	12
I.3. IMPACT DES MEDICAMENTS FQI.....	13
I.3.1. Impacts sur les consommateurs.....	13
I.3.2. Impact sur le secteur pharmaceutique.....	14
I.3.3. Impact sur les gouvernements.....	14
I.4. METHODES DE DETECTION DES MEDICAMENTS FQI.....	14
CHAPITRE II. METHODES D'ANALYSE DES MEDICAMENTS.....	17
II.1. METHODES SEPARATIVES.....	17
II.2. METHODES NON SEPARATIVES.....	18
II.3. MISE AU POINT DES METHODES ANALYTIQUES.....	19
II.3.1. Sélection d'une méthode.....	20

II.3.2. Développement d'une méthode	20
II.3.3. Validation d'une méthode analytique	22
II.3.4. Utilisation en routine	27
II.4. TESTS DE PHARMACOTECHNIE	28
II.4.1. Dureté des comprimés	28
II.4.2. Friabilité des comprimés	29
II.4.3. Désagrégation des comprimés	30
II.4.4. Dissolution des comprimés	32
CHAPITRE III. PHARMACOLOGIE DES ANTIBIOTIQUES	34
III.1. MÉCANISMES D'ACTION	34
III.1.1. Action sur la paroi bactérienne	34
III.1.2. Action sur la synthèse protéique	36
III.1.3. Action sur les voies métaboliques	36
III.1.4. Les anti-anaérobies	37
III.2. MÉCANISME DE RÉSISTANCE	38
III.2.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique	39
III.2.2. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique	39
III.2.3. Modification de la concentration de l'antibiotique dans la bactérie	40
III.2.4. Pompes à efflux	41
III.2.5. Protection de la cible antibiotique	41
III.2.6. Piégeage de l'antibiotique	42
III.3. SPECIFICITES PHARMACOLOGIQUES DES MOLECULES SELECTIONNEES	43
III.3.1. Azithromycine et érythromycine	43
III.3.2. Céfadroxil et céfixime	44
III.3.3. Chloramphénicol	45
III.3.4. Tétracycline	46
II ^{ème} PARTIE : DONNEES EXPERIMENTALES	48
CHAPITRE IV. CADRE EXPERIMENTAL, MATERIEL, METHODES ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	48
IV.1. CADRE EXPERIMENTAL	48
IV.1.1. Collecte des échantillons	48
IV.1.2. Activités de laboratoire	49
IV.2. MATERIEL	50
IV.2.1. Réactifs et solvants	50
IV.2.2. Standards	51

IV.2.3. Petit matériel et verrerie	51
IV.2.4 Appareils	52
IV.3. METHODES	53
IV.3.1. Echantillonnage.....	53
IV.3.2. Méthodes analytiques.....	57
IV.3.3. Application de méthodes analytiques validées (utilisation en routine).....	67
IV.4. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	68
IV.4.1. Tests physiques	68
IV.4.2. Tests pharmacotechniques	69
IV.4.3. Identification de substances actives	73
IV.4.4. Dosage des principes actifs	74
IV.4.5. Assurance qualité	90
CHAPITRE V. PRESENTATION DES RESULTATS ET LEUR DISCUSSION.....	92
V.1. ENQUETE SUR L'UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES.....	92
V.1.1. Répartition des antibiotiques les plus utilisés dans l'enquête	92
V.1.2. Répartition des antibiotiques utilisés selon les services	93
V.1.3. Antibiothérapie instaurée suivant les infections.....	93
V.1.4. Antibiotiques utilisés selon les catégories d'âge	98
V.1.5. Pathologies infectieuses rencontrées	99
V.2. ECHANTILLONNAGE, INVESTIGATION DE L'AUTHEENTICITE ET INSPECTION VISUELLE DES ECHANTILLONS COLLECTES.....	102
V.2.1. Echantillons collectés selon les pays de fabrication et lieux de collecte.....	112
V.2.2. Répartition des échantillons selon les principes actifs	113
V.2.3. Prix d'acquisition des échantillons.....	114
V.2.4. Investigation de l'authenticité auprès de l'ARP et fabricant.....	114
V.2.5. Inspection visuelle	116
V.3. REVUE SYSTÉMATIQUE DES MÉTHODES ANALYTIQUES UTILISEES.....	118
V.3.1. Aspect général	118
V.3.2. Caractéristiques des principes actifs.....	120
V.3.3. Caractéristiques des méthodes.....	121
V.3.4. Diluants	129
V.3.5. Phases mobiles et paramètres de validation	130
V.4. DÉVELOPPEMENT, VALIDATION ET APPLICATION DES MÉTHODES SEPARATIVES	132
V.4.1. Développement des méthodes séparatives	132
V.4.2. Validation des méthodes séparatives.....	139
V.4.3. Application des méthodes HPLC validées	147

V.5. DÉVELOPPEMENT, VALIDATION ET APPLICATION DES MÉTHODES NON SEPARATIVES	151
V.5.1. Développement des méthodes non séparatives	151
V.5.2. Validation des méthodes non séparatives.....	154
V.5.3. Application de méthode non séparatives (utilisation en routine)	161
V.5.4. Aperçu général de la conformité des échantillons analysés	165
V.6. TESTS PHYSIQUES ET PHARMACOTECHNIQUES.....	168
V.6.1. Uniformité de masse et test de variation de masse.....	168
V.6.2. Test de friabilité.....	172
V.6.3. Désagrégation des comprimés	174
V.6.4. Résultats du pH et du volume à reconstituer	176
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	178
BIBLIOGRAPHIE	181
ANNEXES	i
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES.....	xiv

INTRODUCTION

Les progrès en matière de santé se sont globalement améliorés au cours de ces dernières décennies mais les efforts qui permettent d'obtenir ces résultats se heurtent constamment à la menace que représentent les médicaments falsifiés et de qualité inférieure (FQI) (Schneider et Nam, 2020 ; Schäfermann *et al.*, 2020). Ces types de médicaments sont responsables de nombreux échecs thérapeutiques, de morbi-mortalités et d'intoxications médicamenteuses enregistrés dans le monde (Peyraud *et al.*, 2017 ; Mackey, 2018).

Les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) renseignent que 10,5 % des substances médicamenteuses qui circulent dans le monde sont FQI (OMS, 2017a). L'Afrique, l'Asie et plusieurs pays de l'Amérique Latine sont les régions les plus affectées avec plus de 30 % (Ghanem, 2019 ; Khurelbalt *et al.*, 2020).

Parmi les médicaments, les antibiotiques sont les plus visés depuis 2013 (OMS, 2017b ; Tie *et al.*, 2018, Schafermann *et al.*, 2020). Il a été rapporté que 50 % des antibiotiques en circulation dans le monde sont FQI, ce taux pouvant atteindre 78 % dans les pays en développement (Delepierre *et al.*, 2012 ; Kelesidis et Falagas, 2015). Ceci s'expliquerait par le fait que le marché des antibiotiques est une activité très lucrative. En 2015, le marché des antibiotiques avait représenté une valeur de 39,8 milliards de dollars américains. D'ici 2024, ce chiffre devrait atteindre 57 milliards (James, 2016 ; Tie *et al.*, 2018).

Les quelques études relatives à la problématique de médicaments de qualité inférieure effectuées en République Démocratique Démocratique du Congo (RDC) indiquent que ce pays est particulièrement touché par la falsification de médicaments (Kalonji, 2012 ; Kalonji *et al.*, 2013 ; Mbinze, 2015 ; Schiavetti *et al.*, 2018 ; Mufusama *et al.*, 2018).

Tenant compte des effets dévastateurs de la falsification de médicaments et de la nécessité de préserver et d'améliorer la santé de la population, nombreuses stratégies ont été mises en place en RDC pour tenter de lutter contre ce fléau sanitaire (Bukasa, 2013 ; Marini *et al.*, 2010). Ces stratégies doivent être renforcées avec des outils analytiques, se fondant sur des méthodes performantes, adéquates, simples et moins coûteuses. Grâce à ces méthodes, les décisions de responsables de réglementation pharmaceutique auront un soutien scientifique (Marini *et al.*, 2010).

Considérant la menace à laquelle fait face la République Démocratique du Congo, il est possible que (i) plus les nouvelles méthodes de détection de médicaments FQI sont disponibles, plus les falsificateurs auront des difficultés à les contourner, étant donné qu'ils ne les maîtrisent pas

encore (ii) le développement de méthodes analytiques réalisé à travers l'étude de paramètres analytiques (nature de solvants et diluants, temps d'analyse, types de colonnes analytiques etc.) permettra d'obtenir de nouvelles méthodes analytiques économiquement accessibles, performantes, moins coûteuses et capables de détecter les antibiotiques FQI (iii) l'application des méthodes d'analyse quantitative, qualitative et pharmacotechniques permettront à détecter les antibiotiques FQI.

C'est dans ce contexte que l'objectif général de cette étude est de contribuer à la lutte contre la circulation de médicaments FQI, en mettant au point de nouveaux outils analytiques performants, adéquats et simples.

Pour ce faire, cette étude poursuit les objectifs suivants : (i) d'identifier les antibiotiques les plus utilisés à Lubumbashi (ii) de rechercher dans la littérature de méthodes d'analyse utilisées dans la détection des antibiotiques FQI (iii) de développer de méthodes d'analyse simples, adéquates et performantes pour ensuite les valider (iv) d'appliquer ces méthodes développées et validées aux échantillons prélevés à Lubumbashi et (v) d'appliquer les méthodes de pharmacotechnie et physiques à ces échantillons.

Ce travail a concerné six antibiotiques (azithromycine, céfadroxil, céfixime, chloramphénicol, érythromycine et tétracycline) choisis sur base d'une étude descriptive transversale avec récolte rétrospective des données relatives à l'utilisation des antibiotiques dans les milieux hospitaliers à Lubumbashi (Mwamba *et al.*, 2018).

Etant donné que la chromatographie liquide à haute performance est la méthode séparative la plus utilisée et adéquate pour contrôler la qualité de médicaments et que la spectrophotométrie UV-visible est la méthode non séparative mise à profit dans les pays à revenus faibles pour contrôler la qualité de médicaments essentiels, nous nous sommes focalisés sur ces deux techniques analytiques (Martino *et al* 2010 ; Mbinze *et al.*, 2015a ; Koczwara et Dressman, 2017).

A cet effet, une revue systématique de méthodes chromatographiques liquides et spectrophotométriques UV-Visible décrites a été réalisée (Mwamba *et al.*, 2019).

La mise au point de méthodes d'analyse a pris en compte le coût d'analyse dans le but de permettre à ce que ces méthodes soient exécutées dans les pays en développement dans le cadre de contrôle qualité en routine. Cette mise au point s'est réalisée en trois phases : développement, validation et application. La phase de développement de méthodes a consisté à déterminer des conditions expérimentales optimales des analytes étudiés. Concernant la validation, la stratégie de l'erreur totale représentée par le profil d'exactitude a été utilisée comme outil décisionnel en

tenant compte des directives ICHQ₂R₁ (Hubert *et al.*, 2007a ; ICH, 2008). Les méthodes développées et validées ont ensuite été appliquées aux échantillons en vue de garantir leur utilisation en routine.

La première partie de ce travail passe en revue les généralités relatives à la falsification de médicaments, les méthodes d'analyse, la pharmacologie des antibiotiques avec un aperçu des molécules étudiées dans ce travail ; la seconde partie décrit le cadre du travail, le matériel et les méthodes, les protocoles expérimentaux, les résultats et leur discussion, suivi d'une conclusion et de perspectives.

I^{ère} PARTIE : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Cette partie comprend trois chapitres : le premier revient sur les notions relatives à la falsification de médicaments, le second aborde les méthodes utilisées dans le domaine d'analyse des médicaments et le troisième reprend quelques généralités relatives à la pharmacologie des antibiotiques.

CHAPITRE I. FALSIFICATION DE MEDICAMENTS

La falsification de médicaments constitue un fléau sanitaire permanent pour la Santé Publique de par le danger qu'elle présente dans le traitement de diverses pathologies (Ghanem, 2019). Ce chapitre aborde la terminologie de la falsification de médicaments, l'état des lieux, l'impact sur le plan sanitaire et socio-économique ainsi que les méthodes d'analyse utilisées pour détecter les médicaments falsifiés et de qualité inférieure.

I.1. DEFINITIONS

La falsification se rapporte à une action qui consiste à altérer volontairement une substance ou un autre élément en vue d'abuser de la bonne foi du consommateur (IRACM, 2018). Plusieurs notions sont employées pour tenir compte de la totalité de la problématique de la falsification de médicaments.

I.1.1. Médicament contrefait

Ce terme a longtemps été utilisé pour désigner tout médicament qui est délibérément et frauduleusement étiqueté pour tromper quant à son identité et/ou son origine. Il pouvait concerner les médicaments de marque déposée comme les produits génériques. Les principes actifs pouvaient être corrects, erronés, absents, à des doses trop faibles ou trop fortes, le conditionnement du produit pouvait être falsifié (OMS, 2010). Depuis 2017, le terme "contrefait" est devenu désuet (OMS, 2017a ; Rasheed *et al.*, 2018). En effet, la contrefaçon a une connotation très générale et juridique insistant sur la notion d'atteinte aux droits de propriété intellectuelle et ne couvre pas l'ensemble des actes frauduleux qui peuvent porter atteinte, directement ou indirectement, à la Santé Publique. En outre, cette définition ne prend pas en compte les normes particulières de qualité et de traçabilité que doivent respecter les médicaments (Robin, 2013). D'où, il a été proposé d'utiliser le terme «falsification» à la place de «contrefaçon».

I.1.2. Médicament falsifié

Il est défini comme tout médicament comportant une fausse présentation (OMS, 2017a) :

- de son identité, y compris de son emballage et de son étiquetage, de sa dénomination ou de sa composition s'agissant de n'importe lequel de ses composants, y compris les excipients et la substance active ;
- de sa source, y compris de son fabricant, de son pays de fabrication ou du titulaire de son autorisation de mise sur le marché (AMM) ;
- de son historique y compris des enregistrements et des documents relatifs aux circuits de distribution utilisés.

Un médicament falsifié peut donc présenter, plusieurs caractéristiques :

- Substitution de la molécule active déclarée sur l'emballage par une autre : la substance active étant substituée, il est incertain de traiter la pathologie pour laquelle le médicament est indiqué. On peut ici évoquer le cas rapporté par Habyalimana et collaborateurs en 2015 dans lequel un médicament censé contenir la quinine contenait plutôt le métronidazole (Habyalimana *et al.*, 2015) ;
- Absence du principe actif responsable de l'activité pharmacologique : le principe actif étant absent, le médicament est dépourvu de toute réponse thérapeutique. Mufusama et collaborateurs (2018) ont rapporté que des médicaments à base de la combinaison artémether-luméfanthrine ne contenaient aucun des deux principes actifs déclarés sur l'emballage (Mufusama *et al.*, 2018).
- Présence du principe actif mais en quantité inférieure, insuffisante pour produire l'effet thérapeutique : cette caractéristique est la plus rapportée dans la littérature (Legris, 2005 ; Kalonji, 2012 ; Tshilombo *et al.*, 2018) ;
- Quantité excessive du principe actif : la quantité du PA peut être supérieure à celle indiquée sur l'emballage (Chaudhry et Stumpf, 2013) ;
- Présence d'une quantité correcte en principe actif : des cas avérés de falsification des médicaments ont été rapportés mais la teneur en principe actif était correcte (Legris, 2005 ; Aka *et al.*, 2005).

Il convient de noter que la présence d'impuretés, d'ingrédients toxiques, les faibles biodisponibilités et désintégration d'une forme galénique peuvent également caractériser un médicament falsifié (Kalonji *et al.*, 2012 ; Kelesidis et Falagas, 2015 ; Atici *et al.*, 2017).

I.1.3. Médicament sous-standard

Il peut aussi être désigné par médicament « de qualité inférieure », « hors spécification » ou « non conforme ». Il s'agit en effet, d'un médicament qui n'est pas conforme aux normes et aux spécifications de qualité, suite à des conditions inadéquates de fabrication ou à un certain laxisme qui affecte la qualité du produit fini (Robin, 2013). Cette non-conformité résulte souvent d'une exécution défectueuse du travail par l'entreprise, due notamment à un défaut de compétence, de la négligence ou à un contrôle bâclé, voire inexistant de cette exécution (Brebion, 2014). Les défauts de qualité sont dans la plupart des cas non intentionnels. Ce genre de situation est l'apanage des pays en développement car les industries pharmaceutiques qui y œuvrent ne respectent pas toujours les standards de qualité et les spécifications associées, pouvant garantir la qualité des produits finis (Mbinze, 2015). Au Pakistan par exemple, le gouvernement a dû fermer plus de 300 industries pharmaceutiques non reconnues par le gouvernement ; ces industries ne disposaient pas d'un système qualité et produisaient des médicaments falsifiés (Anonyme, 2014). Une situation similaire s'est également produite en RD Congo où le Ministère de la Santé Publique a procédé à la fermeture de trois industries pharmaceutiques qui ne respectaient pas les bonnes pratiques de fabrication des médicaments (RADIOOKAPI, 2013).

I.1.4. Médicament non enregistré

Les standards de qualité et les spécifications d'un médicament sont analysés et évalués par une Autorité de Réglementation Pharmaceutique (ARP), avant que sa commercialisation ne soit autorisée, via une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) (Robin, 2013). Un médicament non enregistré est commercialisé, distribué ou utilisé sans avoir été préalablement évalué et/ou approuvé par l'ARP d'un pays en fonction de la législation en vigueur qui y est décrite (OMS, 2017a). El-Jardali *et al* (2015) rappellent l'importance de n'utiliser que des produits enregistrés et autorisés par les autorités sanitaires avant leur commercialisation.

I.1.5. Médicament dégradé

Il s'agit de tout médicament qui, suite à une instabilité chimique ou biologique causée par des conditions de conservation inappropriées, plus particulièrement sous les climats tropicaux, subit une perte de la qualité d'origine ou une expiration avant même la date légale de celle-ci (Marini *et al.*, 2010). Dans ce cas, un médicament peut être au départ de bonne qualité ; mais finit par perdre cette caractéristique, parce qu'il est conservé dans de mauvaises conditions. Ce type de médicaments est surtout rencontré dans les pays en développement où les produits

pharmaceutiques destinés à la vente sont exposés dans des conditions déplorables comme l'illustre la figure 1.



Figure 1. Illustrations de la vente de médicaments dans de mauvaises conditions de conservation (Mwamba, 2017).

I.2. ETAT DES LIEUX

La falsification de médicaments a été identifiée comme un problème de Santé Publique depuis plus d'un quart de siècle. A ce jour, elle ne cesse de connaître une ascension inquiétante dans le monde (Fantasia et Vooyo, 2018; Grech *et al.*, 2018; Vickers *et al.*, 2018). Cependant, il est toujours difficile d'évaluer avec exactitude l'ampleur de ce phénomène car (i) les falsificateurs utilisent des réseaux d'approvisionnement clandestins dont il est difficile de coordonner la traçabilité ; (ii) il s'agit de marchés illicites qui sont complexes à évaluer quantitativement de manière exacte et (iii) certains patients ne se rendent forcément pas compte que le produit qu'ils prennent peut être falsifié ou contenir des ingrédients altérés (Fantasia et Vooyo, 2018).

La revue systématique réalisée par Koczwara et Dressman (2017) sur l'état des lieux de la falsification des médicaments dans le monde a permis d'évaluer 41 articles. L'étude avait pour objectif d'évaluer si les données disponibles sur la falsification des médicaments étaient suffisantes pour tirer des conclusions quant à la prévalence. Malgré une étude poussée, les

auteurs ont trouvé qu'il était difficile de donner des estimations fiables quant à la prévalence de la falsification de médicaments dans le monde de par la grande hétérogénéité des données.

Néanmoins, il est admis que la falsification de médicaments affecterait 10,5 % du marché mondial (Ozawa *et al.*, 2018; Rebiere *et al.*, 2017). Mais la répartition n'est pas uniforme car dans les pays en développement, notamment en Afrique centrale, plus de 25 % des médicaments seraient falsifiés ou de qualité inférieure, ce nombre pouvant s'élever à 80 % dans certaines régions d'Afrique subsaharienne (Marini *et al.*, 2010; Newton *et al.*, 2017; Wafula *et al.*, 2017). Dans les pays en développement ce sont les antiinfectieux qui sont de plus en plus visés. Il a été rapporté que 78 % d'antiinfectieux falsifiés et de qualité inférieure circuleraient dans ces pays (Delepierre *et al.*, 2012; Kelesidis et Falagas, 2015). La prédominance de la falsification des antiinfectieux par rapport aux autres groupes pharmaco-thérapeutiques peut se justifier d'une part, par le fait que les pathologies infectieuses y sévissent de manière récurrente (Labi *et al.*, 2018; Phoba *et al.*, 2014). Les antiinfectieux constituent donc les médicaments majeurs auxquels la population a recours pour se soigner ; d'autre part, le marché des antibiotiques a sensiblement augmenté ces dernières années (James, 2016 ; Tie *et al.*, 2018).

Par contre, Dans les pays industrialisés, la proportion est estimée à 1 % (Dégardin *et al.*, 2014; Gaudiano *et al.*, 2008). Les hormones, les antimétabolites, les antiviraux et les médicaments liés au mode de vie tels que les traitements de l'obésité ou de troubles de l'érection sont les plus affectés par la falsification (Dégardin *et al.*, 2014; Sacré *et al.*, 2011).

Il est rapporté que les antibiotiques falsifiés dans le monde sont surtout les anciens antibiotiques d'utilisation courante : bêta-lactamines (50 %) ; quinolones (12 %) ; macrolides, lincosamides et synergistines (11 %) ; cyclines (7 %) (Delepierre *et al.*, 2012). Différents types de falsification d'antibiotique ont été signalés : sans principe actif (43 %), mauvaise qualité (24 %), faible dosage (21 %), mauvais principe actif (7 %), mauvais conditionnement (5 %) (Delepierre *et al.*, 2012; Kelesidis et Falagas, 2015).

Les antibiotiques sont ainsi les médicaments pour lesquels les cas de falsification sont les plus signalés en Afrique (IMPACT, 2008 ; Newton *et al.*, 2006 ; Al-qatamin, 2012 ; Harris *et al.*, 2009).

Par ailleurs, la falsification des antimalariques reste d'actualité (Khuluza *et al.*, 2017; Yemoa *et al.*, 2017 ; Ozawa *et al.*, 2019). L'OMS indique que 90 % des antimalariques sont de qualité inférieure en Afrique dont 30 % falsifiés (Habyalimana *et al.*, 2015; Karunamoorthi, 2014; Kelesidis et Falagas, 2015). Nous pouvons évoquer l'exemple de la saisie en Angola d'environ 1,4 million de boîtes de combinaisons à base d'artémisinine (ACT) falsifiées (Newton *et al.*,

2017). En 2003, 88 % de l'artésunate en monothérapie à administration orale vendus dans le secteur privé étaient falsifiés au Laos (Sengaloundeth *et al.*, 2009 ; Newton *et al.*, 2017).

Ces considérations indiquent que les antiinfectieux de mauvaise qualité compliquent la prise en charge des pathologies infectieuses qui font partie des pathologies les plus dévastatrices dans le monde, particulièrement dans les pays en développement comme la RD Congo.

I.2.1. Situation de la falsification des médicaments en RDC

La République Démocratique du Congo est le deuxième pays le plus vaste d'Afrique après l'Algérie. Elle est également le pays le plus vaste et le plus peuplé de l'Afrique Centrale, avec une superficie de 2 345 409 km² avec plus de 80 millions d'habitants (PNAM, 2010 ; CIA, 2018).

Malgré ses immenses ressources naturelles, la RDC est actuellement classée (176^{ème} sur 186 pays) parmi les pays les plus pauvres du monde, avec un indice de développement humain faible (OMS, 2017c). Les indicateurs présentés dans le tableau I montrent que le système de santé du pays connaît des difficultés majeures.

Tableau I. Les indicateurs en RDC

Population totale (en millions)	85,026
% de moins de 15 ans	44,9
% de plus de 60 ans	4,5
Taux de mortalité néonatale	28
Taux de mortalité	104
Taux de mortalité maternelle	846
Couverture par le vaccin DTP3	77
Naissances assistées par du personnel de santé qualifié	80
Densité de médecins	0,107
Densité d'infirmières et de sages femmes	0,529
Espérance de vie à la naissance totale, hommes et femmes (en années)	59
% d'enfants correctement vaccinés	59
Taux de croissance du PIB estimée	6,9
% de la population utilisant des installations d'assainissement améliorés	55
% des populations ayant un accès durable à une source d'eau potable	50,4

Source : (OMS, 2017c)

Avec 9000 km, les frontières de la RDC sont parmi les plus longues du continent. Le pays est délimité au nord par la République Centrafricaine et le Soudan ; à l'est par l'Ouganda, le Rwanda, le Burundi et la Tanzanie ; au sud par la Zambie et l'Angola et à l'ouest par la République du Congo, l'enclave de Cabinda et l'Océan Atlantique (figure 2). Elle comptait 11 provinces jusqu'en 2014 mais actuellement elle en compte 26 (PNAM, 2010 ; CIA, 2019).

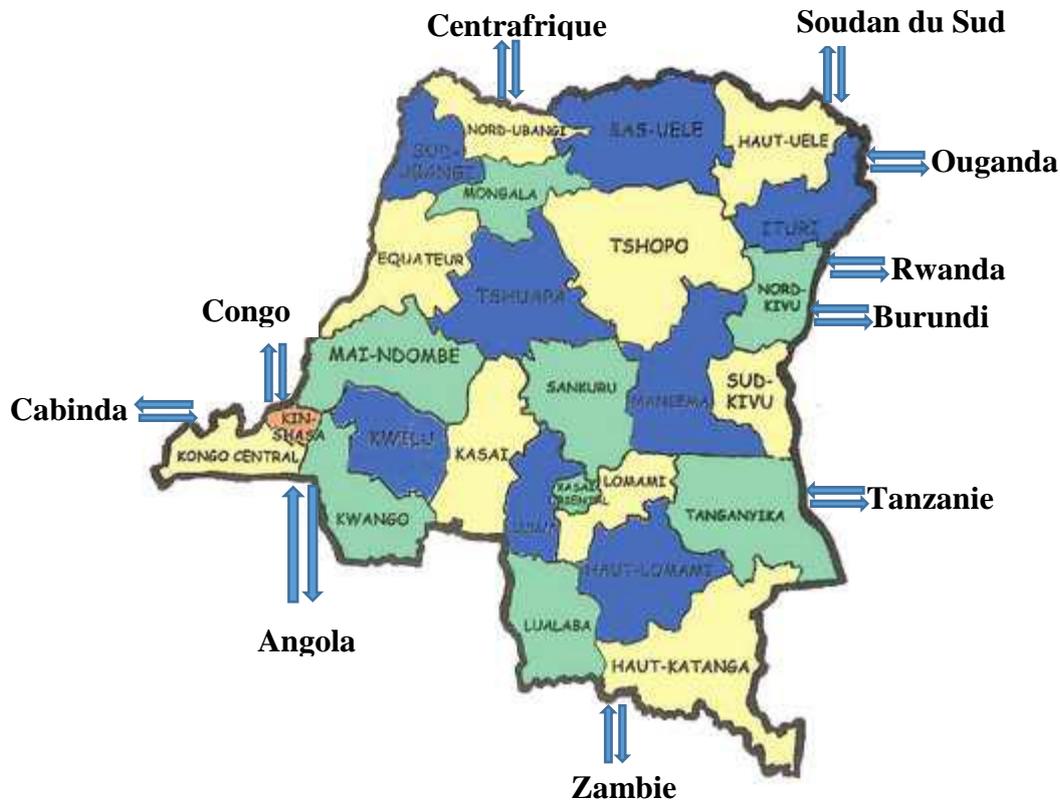


Figure 2. Carte administrative des 26 provinces de la RDC et échanges frontaliers potentiels (PNAM, 2008)

Au regard du nombre des frontières qui entourent le pays, il est clair qu'il existe un fort potentiel d'entrée des médicaments par contrebande, qui justifierait en partie la circulation de médicaments de qualité douteuse dans ce pays. Cependant, il n'existe pas des données consolidées relatives à la falsification des médicaments en RDC notamment à cause du manque d'études de grande ampleur dans le pays.

Un cas a été rapporté par le Ministère Congolais de la Santé Publique en 2009 et en 2012 ; il s'agissait de quinine gouttes orales et d'amoxicilline en Suspension buvable. L'action, menée par INTERPOL en République du Congo du 04 au 05 juin 2013 et en RD Congo du 10 au 11 juin 2013, avait permis de retirer du marché plus de 70 tonnes des médicaments falsifiés (BUKASA, 2013).

En septembre 2017, l'Office Congolais de Contrôle (OCC) a saisi plus d'une tonne de médicaments antipaludéens, des comprimés de COARTEM, COMBIART et FANSIDAR. Après une série d'analyses, ces antipaludéens ne contenaient pas de principe actif déclaré sur l'emballage (RADIOOKAPI, 2018).

I.2.2. Quelques études de la falsification menées en RDC

Des publications scientifiques ont rapporté des cas de falsification des médicaments en RDC. C'est notamment le cas en Ituri, où une épidémie de réactions dystoniques avait causé la mort de 11 personnes entre 2014 et 2015. Ces patients étaient soignés pour une méningite. Les investigations ont révélé que la cause de cette épidémie était plutôt due à la consommation de comprimés étiquetés comme diazépam mais qui contenaient en fait de l'halopéridol surdosé qui n'était pas déclaré sur l'emballage (Peyraud *et al.*, 2017).

Par ailleurs, quelques études sur la problématique des antipaludéens de qualité inférieure ont été menées. En 2012, Kalonji a montré que, sur 77 antipaludéens commercialisés à Lubumbashi, 48 étaient de mauvaise qualité en termes de teneur en principe actif et les profils biopharmaceutiques. Ces non-conformités étaient caractérisées par un sous-dosage, parfois un surdosage en principe actif (Kalonji, 2012).

Notre enquête sur la falsification des antipaludéens à Lubumbashi a montré que 13 % des médicaments collectés étaient falsifiés, sur base de leur légalité déterminée auprès des fabricants et/ou de l'autorité de réglementation pharmaceutique (Mwamba *et al.*, 2016).

Mufusama *et al* (2018) ont rapporté que, sur 150 médicaments à base de combinaison artemether+lumefantrine collectés dans 8 villes du pays (Goma, Kikwit, Kinshasa, Kisangani, Lubumbashi, Matadi, Mbandaka et Mbujimayi), 78 contenaient une teneur inférieure soit en artéméther (46) soit en luméfanthrine (32), 25 étaient surdosés soit en artéméther (17) soit en lumefantrine (8) et 4 échantillons ne contenaient pas le principe actif déclaré.

Concernant les antibiotiques, peu de publications scientifiques sont disponibles. Nous avons rapporté que 31,7 % des antibiotiques commercialisés à Lubumbashi étaient falsifiés sur base de l'inspection visuelle attentive du produit et de l'emballage telle que préconisée par l'OMS. L'ampicilline, le mébendazole et le métronidazole étaient les molécules les plus concernées (Mwamba *et al.*, 2015).

Notre seconde étude sur six principes actifs, amoxicilline, acide clavulanique, albendazole, mébendazole, métronidazole et quinine, a montré que tous étaient concernés par des problèmes de non-conformités avec différents types d'anomalies : pour 32 échantillons, le principe actif était en quantité inférieure (sous-dosage) ; pour 3 échantillons, le principe actif était sur-dosé et 2 échantillons avaient présenté à la fois un sous-dosage et un surdosage (médicament contenant plusieurs principes actifs) (Mwamba, 2017).

Tshilombo *et al* (2018) ont analysé, des Suspensions buvables d'amoxicilline+clavulanate de potassium, montrant que 28 % des échantillons concernés étaient sous-standards, en termes de

pH, teneur en principe actif et/ou l'absence de clavulanate de potassium (Tshilombo *et al.*, 2018).

Ces quelques données relatives à la falsification des médicaments en RD Congo montrent que ce phénomène constitue une réelle menace pour la Santé Publique qu'il faut absolument combattre. La lutte contre ce fléau devrait occuper une place prioritaire dans les actions de tous les acteurs qui œuvrent dans le domaine pharmaceutique.

I.2.3. Faiblesses du système de santé en RDC

Il est établi que le système pharmaceutique de la RD Congo dispose de plusieurs faiblesses majeures qui sont sans nul doute des facteurs favorisant la circulation des médicaments de qualité douteuse (PNAM, 2008) :

- L'absence d'une loi pharmaceutique et de réglementations adaptées, efficaces et bien appliquées ;
- La vente des médicaments dans des endroits inappropriés et insalubres ;
- La corruption et des conflits d'intérêts ;
- Le coût élevé des médicaments dû à l'absence d'une politique de tarification des produits pharmaceutiques ;
- L'insuffisance du système d'assurance qualité (Bonnes Pratiques de Fabrication, Bonnes Pratiques de Distribution et Bonnes Pratiques Officinales) et de l'application du système OMS de certification de la qualité des produits entrant dans le commerce international ;
- Le manque d'une stratégie analytique qui consiste en la création et au renforcement des laboratoires de contrôle de qualité.

Parmi ces faiblesses, la dernière attire particulièrement notre attention en rapport avec notre travail de thèse. En effet, la présence de laboratoires de contrôle qualité des produits médicamenteux finis est un facteur capital pouvant influencer le taux de circulation des médicaments FQI dans un pays donné ; ces laboratoires constituent en effet une sonnette d'alarme pour les autorités sanitaires chaque fois que de faux médicaments sont détectés. Les falsificateurs redouteront d'être identifiés par des enquêtes que les autorités pourront déclencher suite à la détection des médicaments FQI.

Par le contrôle externe de leurs propres laboratoires et procédures, les industries pharmaceutiques légales seront plus à même de libérer des lots des médicaments conformes sur le marché.

I.3. IMPACT DES MEDICAMENTS FQI

La prise des médicaments FQI peut être extrêmement dangereuse pour les consommateurs, mais aussi un manque à gagner pour l'économie d'un pays et pour les industriels (Pennaforde, 1999 ; Saini *et al.*, 2011 ; Shah *et al.*, 2015 ; Hôllein *et al.*, 2016 ; Ozawa *et al.*, 2018) :

I.3.1. Impacts sur les consommateurs

Les conséquences de la falsification des médicaments sont importantes, parce qu'elles touchent directement la santé et la sécurité du consommateur final (Blackstone *et al.*, 2014 ; Ilko *et al.*, 2016). Il convient de souligner que, dans la plupart des cas, les médicaments falsifiés ne sont pas équivalents aux médicaments authentiques des points de vue qualité, innocuité et efficacité. Et malgré cela, même si leur qualité est conforme et même s'ils renferment la même teneur correcte en PA, leur production, leur transport et leur distribution ne peuvent pas être suivis et contrôlés par l'ARP du pays concerné. Cela implique que tout défaut associé ou tout événement indésirable ne sera pas facilement repéré ni corrigé et que, si nécessaire, il ne sera pas possible de rappeler avec une portée suffisante le produit concerné (Legris, 2005 ; Robin, 2013).

Les effets des médicaments FQI sur les consommateurs peuvent se caractériser par (Legris, 2005 ; Wertheimer *et al.*, 2009 ; Heinzelin *et al.*, 2006 ; Morris et Stevens, 2009 ; Peddicord *et al.*, 2014) :

a) Un échec thérapeutique

C'est le cas pour les médicaments qui ne contiennent aucun principe actif ou un principe actif sous-dosé ; le consommateur est privé des composés indispensables à son traitement, ce qui peut aggraver son état de santé. L'échec du traitement peut conduire à l'aggravation de la maladie et augmenter le coût des traitements ultérieurs.

b) La mise en danger de la santé du patient

Les médicaments FQI peuvent être sur-dosés ou contenir des ingrédients inattendus, voire toxiques, mettant ainsi directement en danger la santé et la sécurité du patient (Asiah, 2009 ; Buowari, 2012 ; Beverly, 2014). En 2009, en Chine, un hypoglycémiant, le glibenclamide, contenait six fois la dose normale, entraînant deux décès et l'hospitalisation de neuf personnes (Chaudhry et Stumpf, 2013). Nous pouvons aussi évoquer un cas survenu en Haïti, où des médicaments à base de paracétamol contenaient le diéthylène glycol qui, une fois ingéré attaque

le système nerveux central, le foie et les reins et peut provoquer une insuffisance rénale mortelle (Junod, 2000 ; Legris, 2005).

c) L'apparition de résistances aux médicaments

La tendance actuelle au sous-dosage s'avère également très inquiétante, tout particulièrement pour les pays en développement (Kelesidis *et al.*, 2007). Dans le cas des antibiotiques ou anti-malariques, le risque de développer des résistances peut être considérablement augmenté (Ndihokubwayo *et al.*, 2013). En effet, un médicament contenant une faible dose de principes actifs peut entraîner une résistance accrue d'une infection et porter ainsi préjudice à l'efficacité des traitements thérapeutiques originaux (Krissi, 2010 ; Newton *et al.*, 2006).

I.3.2. Impact sur le secteur pharmaceutique

La falsification a un impact négatif sur les innovations et freine les investissements pharmaceutiques (Mackey et Liang, 2011). Les titulaires des droits de propriété intellectuelle peuvent décider de renoncer à mettre leurs produits sur le marché pharmaceutique d'un pays où des mesures de prévention de la falsification des médicaments n'ont pas été mises en place (Legris, 2005 ; Harris *et al.*, 2009).

Les laboratoires pharmaceutiques peuvent également voir leurs profits considérablement diminués. Entre 12 et 19 % de leurs profits sont en principe réinvestis dans la recherche et développement de nouveaux médicaments. Ceci est particulièrement grave pour les pays en développement car la plupart des pathologies infectieuses qui y sévissent, telles que le paludisme, la tuberculose ou le sida, nécessitent un constant renouvellement des traitements disponibles du fait de l'apparition de résistances (Moken, 2003 ; Legris, 2005).

I.3.3. Impact sur les gouvernements

La falsification peut intensifier le chômage en réduisant la production des entreprises payant les taxes réglementaires au profit des entreprises clandestines ou étrangères (Lauzon et Hasbani, 2002 ; Ozawa *et al.*, 2018). En outre, dans les pays où sont fabriqués les médicaments FQI et où le droit de la propriété intellectuelle n'est pas assez protégé, les entreprises renoncent à fabriquer leurs produits, ce qui engendre une perte de confiance de la part des investisseurs étrangers, une baisse des exportations éventuelles, une perte directe au niveau des recettes fiscales (Rocher, 2014).

I.4. METHODES DE DETECTION DES MEDICAMENTS FQI

Comme nous venons de le décrire, la falsification des médicaments touche directement à la santé et à la sécurité des consommateurs. Les enjeux sont aussi primordiaux pour les firmes

pharmaceutiques et les gouvernements. La lutte contre la circulation des médicaments falsifiés passe en exploitant des méthodes efficaces pour les détecter mais une fois détectés, il faut aussi prévenir.

L'inspection visuelle attentive du produit, de l'emballage et de l'aspect de la forme pharmaceutique est la première étape pour détecter un médicament potentiellement falsifié (OMS, 2000 ; Dégardin *et al.*, 2014). Des irrégularités indiquent potentiellement une falsification (OMS, 2000 ; Legris, 2005 ; Dégardin, 2013 ; Peddicord *et al.*, 2014).

D'autres techniques, basées sur l'authentification et la traçabilité tout au long de la chaîne de distribution du médicament, peuvent également être appliqués pour détecter les médicaments falsifiés. Les paramètres exploités sont entre autres : hologramme, codes barre, code CIP (Code Identifiant Présentation), le *Datamatrix*, les étiquettes RFID (Radio Frequency Identification) etc. (Robin, 2013).

Cependant, avec une sophistication accrue, les falsificateurs peuvent copier fidèlement l'emballage et l'aspect de la forme galénique de telle sorte que l'examen visuel et les techniques de l'authentification et de la traçabilité à eux seuls ne parviennent pas à détecter la falsification (Dégardin *et al.*, 2014; Oral et Andaç, 2015).

L'autre approche consiste à mener une investigation de la légalité des médicaments auprès des fabricants et des autorités de régulation pharmaceutique des pays de commercialisation et/ou de fabrication. Le fabricant peut à *priori* attester formellement de la légalité du médicament qu'il est censé avoir produit. Les autorités de régulation pharmaceutique peuvent donner des renseignements essentiels quant à la légalité du produit et du fabricant (Aka *et al.*, 2005 ; OMS, 2000).

Toutefois, il est impossible d'obtenir des informations fiables auprès du fabricant si lui-même s'est décidé à falsifier son propre produit ; ceci peut se réaliser soit en réduisant le coût de la présentation et de l'emballage, soit en utilisant des excipients moins coûteux que ceux utilisés lors de la fabrication du produit original, ou même en réduisant la dose du principe actif qui est éventuellement coûteux. Il n'est pas toujours évident d'effectuer cette investigation avec succès à cause de l'incertitude qu'il y a d'obtenir une franche collaboration avec les fabricants ou même les autorités sanitaires de certains pays (Aka *et al.*, 2005 ; OMS, 2000).

Les méthodes de détection évoquées ci-haut sont limitées quant à une détection optimale des faux médicaments. Cependant, les méthodes analytiques offrent une alternative importante pour les détecter. Ces méthodes sont fournies par les monographies officielles (Pharmacopées Américaines, Européenne, Britannique) mais il est parfois difficile de les appliquer dans les

pays à revenu faible à cause notamment (i) de l'accessibilité difficile à ces monographies (qui sont pour la plupart payantes) et aux équipements (ii) de la complexité et du temps d'analyse de certaines méthodes d'analyse proposées.

Les scientifiques tentent alors à proposer des méthodes analytiques simples et rapides. A cet effet, de nombreuses études ont développé et validé des méthodes analytiques des médicaments : HPLC, spectrophotométrie UV/VIS, électrophorèse capillaire, spectroscopie Raman, ... (Akl *et al.*, 2011; Al-dgither *et al.*, 2006; Amin *et al.*, 2007; Baraka *et al.*, 2014 ; Boyer *et al.*, 2012; Debrus *et al.*, 2011; Dowell *et al.*, 2008; El-dien *et al.*, 2006; Gaudio *et al.*, 2008; El-Gindy *et al.*, 2011 ; Dégardin *et al.*, 2016; Gupta *et al.*, 2008; Habyalimana *et al.*, 2017; Hegazy *et al.*, 2015 ; Ikeda *et al.*, 2006; Lindeg *et al.*, 2006; Mahmood *et al.*, 2012; Nicole *et al.*, 2016; Sajonz *et al.*, 2005 ; Wilczynski *et al.*, 2015). Parmi ces méthodes la littérature renseigne que la HPLC est la méthode la plus utilisée pour détecter les médicaments falsifiées (Koczwarra et Dressman, 2017; Martino *et al.*, 2010).

Les méthodes d'analyse des médicaments sont abordées de manière détaillée dans le chapitre suivant.

CHAPITRE II. METHODES D'ANALYSE DES MEDICAMENTS

Les méthodes analytiques concernent plusieurs domaines : le contrôle des médicaments, la bioanalyse dans le cadre des études cliniques et les études de bioéquivalence et même les études environnementales et agroalimentaires (Feinberg *et al.*, 2004 ; Bouadibi, 2014 ; Rozet, 2008). Ci-dessous, nous abordons successivement les méthodes séparatives et non séparatives utilisées dans le contrôle de qualité des médicaments. Ensuite, nous traiterons les données relatives à la mise au point des méthodes analytiques.

II.1. METHODES SEPARATIVES

Ici il s'agit principalement de méthodes qui reposent sur la chromatographie ; méthode de séparation séquentielle basée sur la distribution des composants de l'échantillon entre deux phases, l'une stationnaire et l'autre mobile. La phase stationnaire peut être un solide ou un liquide déposé sur un support solide ou un gel. Elle peut être contenue dans une colonne, étalée en couche, déposée sous forme de film, etc. (Pharmacopée Européenne, 2016). La phase mobile peut être gazeuse ou liquide ou en phase supercritique. La séparation peut reposer sur des phénomènes tels que l'adsorption, la distribution de masse (partage), l'échange d'ions, etc., ou sur des différences de propriétés physico-chimiques moléculaires telles que la taille, la masse, le volume, etc. (Pharmacopée européenne, 2016).

Au cours de ces cinq dernières décennies, peu de techniques analytiques ont connu un essor comparable ni aussi diversifié que les techniques chromatographiques. Ce succès tient, dans une large mesure, au fait que se trouvent associés une méthode séparative rapide et performante et des détecteurs sensibles et variés permettant non seulement, une quantification des analytes séparés, mais aussi, une identification des espèces (Martino *et al.*, 2010 ; Marini *et al.*, 2010).

Un médicament est constitué du ou des principe(s) actif(s) et de la matrice. Dans certains cas, il est difficile de connaître avec précision la composition de la matrice. Considérant le milieu complexe dans lequel le principe actif se trouve, la chromatographie est particulièrement adaptée aux analyses qualitatives et quantitatives des médicaments.

Il existe plusieurs types de techniques chromatographiques : la chromatographie liquide à haute performance, la chromatographie en phase gazeuse, la chromatographie sur couche mince, la chromatographie en phase supercritique etc (Martino *et al.*, 2010). Dans le cadre de ce travail, une attention particulière est portée sur la chromatographie liquide à haute performance.

II.1.1. La chromatographie liquide à haute performance

C'est la technique de référence la plus recommandée et utilisée dans le contrôle qualité des médicaments (Koczawara et Dressman. 2017). En abréviation anglaise, on l'appelle HPLC –

(*High Performance Liquid Chromatography*). Dans ces variantes les plus utilisées, c'est une technique analytique séparative basée sur l'hydrophobicité des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. L'échantillon à analyser est poussé par un éluant liquide (appelé aussi phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides de faible taille. Le débit d'éluant est assuré par une pompe à haute pression. Dans la colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés l'un après l'autre en raison de leurs diverses affinités à l'égard des deux phases (stationnaire et mobile). A la sortie de la colonne, les composés sont détectés le plus souvent à l'aide d'un spectromètre (pouvant être ultraviolet, fluorescent, masse etc.) (Penchev, 2010). Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé la méthode HPLC dans la mise au point de méthodes et pour analyser nos échantillons d'antibiotiques.

II.1.2. Electrophorèse capillaire

C'est une autre méthode séparative, reposant sur la migration à l'intérieur d'un capillaire, sous l'effet d'un champ électrique continu, de substances chargées dissoutes dans une solution d'électrolytes (Pharmacopée Européenne, 2016). Ces dernières années l'électrophorèse capillaire est de plus en plus utilisée dans le contrôle de qualité des médicaments surtout en Amérique du Nord et en Europe (El-Deeb *et al.*, 2016 ; Ahuja et Jimidar, 2008).

Les analytes sont séparés pendant leur migration du fait de leurs mobilités électrophorétiques différentes, et sont détectés à proximité de la sortie du capillaire (Ultraviolet, fluorescence). Le signal du détecteur est envoyé à un appareil qui reçoit et traite ces données, tel qu'un ordinateur. Les données sont affichées sous la forme d'un électrophorégramme, qui donne la réponse du détecteur en fonction du temps. Les analytes séparés apparaissent comme des pics avec des temps de migration différents sur l'électrophorégramme (Skoog *et al.*, 2007).

II.2. METHODES NON SEPARATIVES

Il s'agit principalement des techniques spectroscopiques qui conviennent le mieux à des analyses quantitatives ou qualitatives des médicaments présentés en monothérapie. Par rapport à la chromatographie liquide, ces techniques présentent l'inconvénient de ne pas s'apprêter à l'analyse des composés à l'état de traces et d'impuretés.

Parmi ces méthodes, nous pouvons évoquer la spectrophotométrie UV visible qui est très utilisée dans les laboratoires de contrôle qualité des médicaments dans les pays en développement. Elle consiste à mesurer l'absorbance d'une substance chimique donnée, généralement en solution, à l'aide d'un spectromètre préalablement étalonné sur la longueur

d'onde d'absorption de l'analyte à étudier. Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert. Cette loi décrit que, à une longueur d'onde λ donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à ses propriétés intrinsèques (A spécifique), à sa concentration, et au trajet optique (distance sur laquelle la lumière traverse la solution) (Pharmacopée Européenne, 2016 ; Rouessac *et al.*, 2004) : $A = \epsilon_{\lambda} l C$.

Par ailleurs, ces dernières années les techniques spectroscopiques vibrationnelle Raman surtout celles basées sur l'étude du rayonnement infrarouge ou Proche Infrarouge (PIR) sont de plus en plus utilisées (Rodionova *et al.*, 2019 ; Ciza *et al.*, 2019). L'acquisition rapide, non destructive, polyvalente, peu coûteuse de spectres sans préparation de l'échantillon peuvent justifier une large utilisation du PIR (Sacré, 2011 ; Mbinze *et al.*, 2015b). Le principe de la spectroscopie PIR repose sur l'absorption du rayonnement proche infrarouge par les différents constituants de l'échantillon (Marini *et al.*, 2010). Ce rayonnement couvre la partie du spectre électromagnétique comprise entre 12500 et 4000 Cm^{-1} . Les bandes d'absorption relativement larges dans cette région sont principalement dues aux vibrations harmoniques et de combinaisons des liaisons atomiques de type X-H où X représente les atomes de carbone (C), d'oxygène (O), d'azote (N) ou de soufre (S) et H représente l'atome d'hydrogène (H) des molécules. L'interprétation et l'exploitation des spectres du domaine proche infrarouge sont relativement difficiles compte tenu de la largeur des bandes d'absorption, de leur chevauchement, mais également de l'influence des caractéristiques physiques de l'échantillon. Cette superposition des informations liées aux caractéristiques chimiques et physiques rend indispensable le recours à des outils chimiométriques (prétraitement des multivariées exploratoires, prédictives) pour extraire l'information considérée comme pertinente (Marini *et al.*, 2010 ; Mbinze *et al.*, 2014).

II.3. MISE AU POINT DES METHODES ANALYTIQUES

La mise en œuvre d'une méthode analytique peut se décomposer en quatre phases généralement successives (Bouadibi, 2014 ; Hubert, 2015) :

- Une phase de sélection au cours de laquelle des objectifs et des conditions opératoires initiales sont définis ;
- Une phase de développement, avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences ;
- Une phase de validation (validation interne/externe) précédée, selon les cas, d'une phase de prévalidation ;

- Une phase d'application en routine (usage en routine), incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle ou une revalidation.

II.3.1. Sélection d'une méthode

Point de départ d'une méthode analytique, elle joue un rôle déterminant dans les décisions qui seront prises. Sur ce, elle nécessite de bien cerner la problématique *a priori* aux besoins du laboratoire, (Hubert, 2015). En effet, l'analyste choisit parmi les diverses méthodes physico-chimiques disponibles dans la littérature ou maîtrisées par le laboratoire celle ; qui doit permettre de déterminer le ou les analytes représentatifs du problème analytique à traiter (Bouadibi, 2014).

Cependant, ce choix doit être orienté par les référentiels en vigueur. La norme ISO 17025 : 2017 précise à ce sujet dans son chapitre 7.4.1 que : « *Le laboratoire doit sélectionner une méthode appropriée et informer le client de la méthode choisie. Les méthodes publiées dans des normes internationales, régionales ou nationales, par des organisations techniques de renom ou dans des textes ou revues scientifiques spécialisés, ou spécifiés par le fabricant d'équipement, sont recommandées* » (ISO, 2017). L'utilisation des méthodes normées telle que prônée par ISO 17025 n'est pas toujours applicable pour résoudre les problèmes spécifiques liés aux laboratoires. Dans ce cas, ces derniers peuvent se tourner vers de nouvelles méthodes dont les performances doivent être avérées ou démontrées (Hubert, 2015).

Rozet (2008) a soulevé un certain nombre de questions pouvant servir à opérer une bonne sélection d'une méthode analytique (Rozet, 2008) :

- Quel est l'analyte (s) à rechercher ?
- Quelle est la nature de l'échantillon : les propriétés physiques et chimiques de l'échantillon ?
- Quel est le niveau de concentration de l'analyte (s) étudié ?
- Quel est le niveau d'exactitude nécessaire ?
- Quelles sont les limites d'acceptation des performances de la méthode ?
- Quels sont les autres constituants de l'échantillon qui sont généralement présents ?
- Combien d'échantillons doit-on analyser ?

II.3.2. Développement d'une méthode

La sélection d'une méthode analytique doit être suivie de plusieurs expériences pour pouvoir l'optimiser (Bouadibi, 2014). La réalisation de cette étape peut nécessiter des plans d'expérience qui fourniront à l'analyste, moyennant un nombre d'expériences restreint, un

maximum d'informations pertinentes pouvant expliquer certains effets et prédire les réponses étudiées (Marini, 2006). Ces plans d'expérience font partie de la chimiométrie, branche de la chimie analytique qui utilise les mathématiques, les statistiques et la logique formelle pour concevoir ou sélectionner des procédures expérimentales optimales (Massart *et al.*, 1997 ; Duarte et Capelo, 2006 ; Hubert, 2015).

Il est courant à développer et valider des méthodes en utilisant des logiciels informatiques pour réaliser les plans d'expérience (Mbinze *et al.*, 2013 ; Mbinze *et al.*, 2012 ; De Bleye *et al.*, 2013 ; Mbinze *et al.*, 2014 ; Hubert *et al.*, 2014 ; Habyalimana *et al.*, 2017 ; Debrus *et al.*, 2013).

La littérature rapporte plusieurs types de plans d'expérience : plans de Plackett-Burman, plans factoriels, plans de Taguchi, plans de central composite, plans de Doehlert (Servais, 2005 ; Marini, 2006 ; Hubert *et al.*, 2007). Le choix d'un plan adéquat tient tout d'abord compte de l'objectif poursuivi par l'analyste, du type et du nombre de facteurs à étudier, des informations à recueillir, et même des exigences de l'expérimentateur (Marini, 2006).

Au cours du développement de la méthode, il est nécessaire que les nombreux facteurs qui impactent la réponse soient optimisés pour permettre à l'analyste d'obtenir une condition analytique optimale.

Une approche pouvant être utilisée se base sur l'expérience de l'analyste qui entreprend des essais mesurant l'influence de ces facteurs sur une réponse bien déterminée. Cette méthodologie est désignée *Quality by testing (QbT)*, une approche qui permet la modélisation de la réponse en fonction des facteurs sélectionnés à travers le domaine expérimental étudié. Cette méthodologie est encore largement utilisée et peut s'avérer opportune dans certains cas, comme par exemple (i) lorsque la connaissance préalable de la méthode permet à l'analyste de restreindre le nombre de facteurs à étudier et d'éviter le recours à la planification expérimentale ; (ii) lors d'une optimisation mineure de la méthode ; (iii) lors d'une optimisation de facteurs peu prépondérants et dont l'interaction mutuelle est faible et ; (iv) lorsqu'il est nécessaire de répondre à une problématique de manière urgente,... (Hubert, 2015).

Par ailleurs, la *Qbt* présente un certain nombre d'inconvénients entre autres (i) elle nécessite souvent plusieurs expériences avant de trouver les conditions analytiques appropriées et prend donc à cet effet beaucoup de temps ; (ii) il ne fournit aucune information par rapport au comportement futur du processus, les informations observées sont limitées à ce que constate l'expérimentateur et les possibles interactions entre les facteurs ou variables ne sont pas étudiés (Rozet *et al.*, 2013 ; Deidda *et al.*, 2018 ; Peraman *et al.*, 2015).

C'est dans ce contexte que les directives de l'ICH Q8(R2) décrivent une nouvelle approche *Quality by design (QbD)* qui concernait dans un premier temps le processus de fabrication en industries pharmaceutiques afin de renforcer les stratégies d'évaluation et de la gestion du risque au sein du cycle de vie des méthodes de fabrication (ICH, 2009 ; Deidda *et al.*, 2018).

L'utilisation du *QbD*, s'est élargie aux processus analytiques dans le but d'assurer la qualité du produit et la sécurité du patient (Dispas *et al.*, 2018; Gavin et Olsen, 2008; Kristina et Schmidt, 2018; Schweitzer *et al.*, 2010; Rozet *et al.*, 2013). Dans les procédures analytiques, le terme *AQbD (Analytical Quality-by-Design)* est souvent employé et est défini comme une approche systématique du développement qui, par des objectifs prédéfinis met un accent particulier sur la maîtrise et la compréhension d'une méthode analytique en se basant sur la notion de la gestion du risque de qualité (Deidda *et al.*, 2018).

Les objectifs prédéfinis peuvent être désignés sous le terme *Analytical Target Profile (ATP)* c'est-à-dire que la procédure doit être capable de quantifier un analyte en présence d'autres composés dans une gamme de concentrations définie et centrée sur une valeur nominale, avec une exactitude et une incertitude telles que le résultat obtenu soit compris dans des limites fixées *a priori* autour de la vraie valeur, avec une probabilité minimum définie et déterminée avec un niveau de confiance fixé (Burdick *et al.*, 2013 ; Hubert, 2015). L'estimation de l'incertitude des futurs résultats permet de définir une zone où les objectifs de la méthode sont atteints avec une probabilité de succès définie (Lebrun *et al.*, 2013).

Cette zone appelée, espace de conception, ou « *Design Space (DS)* », représente un sous-ensemble du domaine expérimental soumis à l'étude où l'assurance d'un niveau de qualité fixé est obtenue. Cette nouvelle approche est définie comme la stratégie *Design of experiments - Design Space (DoE-DS)* » combinant donc la planification expérimentale et le concept de « *Design Space* » (Rafamantanana *et al.*, 2012; Vogt et Kord, 2011 ; Hubert, 2015). Elle permet d'allier le bénéfice d'une surface de réponse en tant qu'outil décisionnel avec la gestion du risque associé à la prédiction, grâce à l'évaluation de l'incertitude associée et ce, par rapport à des spécifications qui doivent être rencontrées (Hubert, 2015 ; Kristina et Schmidt, 2018 ; Deidda *et al.*, 2018). En outre, avec l'approche *DoE-DS* , l'optimisation de la méthode analytique obtenue ; permettra d'éviter l'étude de vérification de la robustesse qui est parfois exigée par les agences d'enregistrement des médicaments (Rozet, 2006 ; Bouadibi, 2014).

II.3.3. Validation d'une méthode analytique

Un laboratoire peut souhaiter obtenir un label de qualité, accepté par tous, garantissant la conformité d'un résultat conformément aux normes internationales, principalement ISO 17025

(Hubert *et al.*, 2007a). A cet effet, il doit être capable à tout moment de décrire l'obtention d'un résultat et de justifier sa validité. La clause 7.2.2.1 l'énonce d'ailleurs comme suit : *Le laboratoire doit valider les méthodes non normalisées, les méthodes développées par le laboratoire et les méthodes normalisées employées en dehors de leur domaine d'application prévu, ou autrement modifiées. La validation doit être aussi étendue que l'impose la réponse aux besoins pour l'application ou le domaine d'application donné* (ISO, 2017).

La validation constitue donc une étape cruciale du cycle de vie de toute méthode analytique. Elle est définie comme un ensemble d'opérations effectuées en vue de prouver qu'une procédure est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis pour l'utilisation d'une méthode en routine mais aussi dans le cadre d'invention de nouvelles méthodes (Marini, 2006 ; De Bleye, 2017). A cet effet, il est indispensable de disposer d'un référentiel commun permettant de s'appuyer sur des définitions et des terminologies communes pour cette étape importante du cycle de vie des méthodes analytiques.

C'est dans ce contexte, que plusieurs lignes directives pratiques ont été proposées afin de définir les critères de validation à évaluer pour démontrer la performance d'une méthode analytique. Mais rien n'a été dit sur le niveau de garantie à atteindre pour l'estimation, en termes de nombre de mesures de ces critères. De plus, il y n'a pas un consensus sur la manière d'interpréter les définitions réglementaires de ces critères, la méthodologie spécifique à suivre pour évaluer un critère particulier et les limites d'acceptation appropriées pour un critère donné (Hubert *et al.*, 2004; Hubert *et al.*, 2006 ; Gustavo *et al.*, 2007).

Dans leur étude, Burdick et ses collaborateurs (2013) ont indiqué qu'un consensus semble être dégagé. Ce consensus préconise une nouvelle approche basée sur le principe de 'l'erreur totale'. Suivant ce concept, chaque source d'erreur doit être évaluée simultanément, avec un niveau de risque préalablement déterminé afin de construire un intervalle de tolérance (Hubert, 2015 ; De Bleye, 2017). Celui-ci doit être déterminé sur l'ensemble de la gamme de concentrations considérée.

Cette nouvelle approche se base sur l'utilisation d'une méthodologie statistique, basée sur un intervalle de tolérance de type « β -expectation », qui a été transposée en outil de décision final appelé 'profil d'exactitude'. Ce profil permet de garantir qu'une proportion définie des futurs résultats qui seront fournis par la méthode lors de son utilisation en routine sera bien incluse dans des limites d'acceptation fixées *a priori* en fonction des besoins des utilisateurs (Boudibi, 2014). Dans le cadre de cette thèse, l'approche du profil d'exactitude sera utilisée comme outil de décision dans la validation des méthodes analytiques.

Les principaux critères de validation sont ceux couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse et dont la nécessité de l'étude a fait l'objet d'un large consensus (Hubert *et al.*, 2004; Marini, 2006; Hubert *et al.*, 2007a; Hubert *et al.*, 2007b; ; ICH, 2005; Lee *et al.*, 2006 ; Chandran et Singh, 2007 ; Belouafa *et al.*, 2017) :

1. La spécificité-sélectivité

La spécificité/sélectivité d'une procédure analytique est sa capacité à permettre l'évaluation univoque de la substance à analyser, en présence d'autres composants potentiellement présents. Ces composants comprennent typiquement les impuretés, les produits de dégradations, la matrice etc. (Belouafa *et al.*, 2017). Ce critère est le premier pour évaluer une méthode analytique. Concernant les techniques chromatographiques, le terme « sélectivité » est mieux approprié que « spécificité ». Le degré de sélectivité de la procédure de dosage dépend d'ailleurs de la qualité de la séparation chromatographique et de la sélectivité intrinsèque du mode de détection (Hubert *et al.*, 2007).

2. La Fonction de réponse

C'est la relation qui existe, à l'intérieur d'une gamme de concentration considérée, entre la réponse (par exemple, l'aire sous la courbe, l'absorbance,) et la concentration ou la quantité d'un analyte dans un échantillon. La fonction de réponse la plus simple qui exprime cette relation est appelée courbe d'étalonnage (Hubert *et al.*, 2007).

3. La linéarité

Une procédure analytique est dite "linéaire" lorsqu'elle est capable (dans un intervalle de dosage) de fournir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte (quantité) dans l'échantillon (Bouadibi, 2014).

Le critère de linéarité se réfère donc à la relation entre la quantité introduite et la quantité calculée (résultat) d'analyte à partir de la courbe d'étalonnage tandis que la fonction de réponse se réfère à la relation entre la réponse instrumentale et la concentration (Bouadibi, 2014).

4. La justesse ou erreurs systématiques

Elle exprime l'étroitesse de l'accord entre une valeur de référence (ex : standard international, standard d'une pharmacopée) et la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais. La mesure de la justesse est habituellement exprimée en termes de biais (Marini, 2006). La justesse est liée à des erreurs systématiques des méthodes d'analyse et se réfère ainsi à une caractéristique ou une qualité d'une méthode analytique et non à un résultat généré par cette méthode (Chandran et Singh, 2007).

5. La fidélité ou erreurs aléatoires

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre les résultats des mesures obtenues par l'analyse individuelle de plusieurs prélèvements d'un même échantillon homogène, prélevés dans des conditions prescrites. Elle donne une indication sur les erreurs liées au hasard (Bouadibi, 2014 ; Belouafa *et al.*, 2017).

La fidélité est évaluée à trois niveaux (Hubert *et al.*, 2007b) :

- La répétabilité : c'est une expression de la fidélité de la méthode lorsque celle-ci est reprise dans les mêmes conditions de réalisation, c'est-à-dire même laboratoire, même équipement, même opérateur.
- La fidélité intermédiaire (intra-laboratoire) : il s'agit à ce niveau d'augmenter les sources de variabilités, soit en changeant d'opérateur, soit l'équipement. En effet, il est supposé que l'équipement sur lequel la méthode est valide peut être en panne, soit encore l'opérateur peut tomber malade...
- La reproductibilité (inter-laboratoires) : elle correspond à la concordance entre laboratoires (travaux de collaboration visant généralement la normalisation de la méthode).

La fidélité dépend uniquement de la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée

6. L'exactitude ou erreur totale

Elle exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie. L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématiques et aléatoires, en d'autres termes l'erreur totale est liée au résultat obtenu. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse (biais) et de la fidélité (écart-type), c'est-à-dire l'erreur totale (ICH, 2005 ; Hubert *et al.*, 2007b).

Le profil d'exactitude (erreur totale) est donc basé sur l'intervalle de tolérance d'espérance β de l'erreur totale d'une mesure, erreur qui prend en compte la justesse (biais) et la fidélité (écart-type) (Hubert *et al.*, 2006). Ceci permet la possibilité de contrôler le risque d'acceptation d'une méthode non adéquate. Un autre avantage présenté par cette stratégie est de fournir la garantie que les résultats des mesures qui seront obtenus lors de l'application future de la méthode validée seront inclus dans les limites d'acceptation fixées *a priori* selon les exigences définies (Bouadibi, 2014).

Par ailleurs, le profil d'exactitude est un outil de décision qui prend en compte le risque associé à la méthode. Cette notion de risque est liée à la garantie concernant la future analyse des

échantillons inconnus tout en appliquant la méthode validée (Bouadibi, 2014). Il constitue également un outil statistique décisionnel qui inclut les autres paramètres de validation qui sont normalement évalués de manière individuelle (Deidda *et al.*, 2018; Shewiyo *et al.*, 2013 ; Elkarbane *et al.*, 2015).

Aussi, le profil d'exactitude peut servir à accepter ou rejeter une méthode analytique suivant l'usage attendu (Bouadibi, 2014). Il s'obtient en reliant d'une part les bornes inférieures de l'intervalle de tolérance du niveau de concentration entre elles et les bornes supérieures de l'intervalle de tolérance du niveau de concentration comme illustré dans la figure 3.

D'un point de vue pratique, cette stratégie de validation peut se résumer en six étapes reprises ci-après (Bouadibi, 2014):

- Sélection des limites d'acceptation, considérant l'usage attendu de la méthode,
- Ajustement d'un modèle de régression à partir des standards de calibration,
- Calcul des concentrations des standards de validation à partir du modèle sélectionné,
- Détermination du biais moyen à chaque niveau de concentration,
- Calcul des limites de tolérance bilatérales pour les résultats attendus au niveau β à chaque niveau de concentration en considérant le biais et l'écart-type de fidélité intermédiaire,
- Etablissement du profil d'exactitude (figure 3), représentant comme fonction de la concentration, le biais moyen, l'intervalle de tolérance des valeurs attendues au niveau β et les limites d'acceptation.

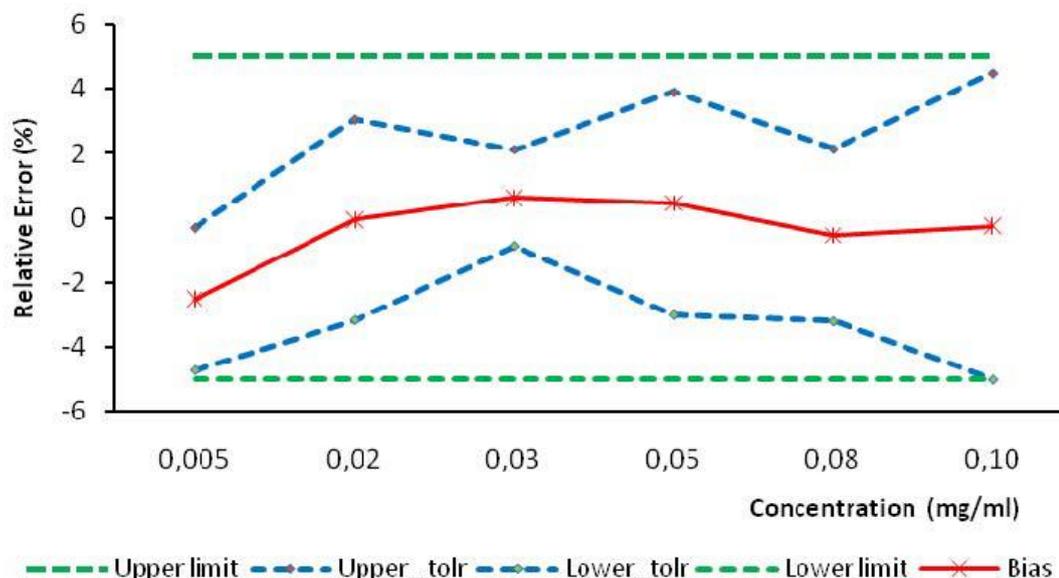


Figure 3. Exemple d'un profil d'exactitude (Bouadibi, 2014)

7. La robustesse

La robustesse d'une procédure analytique est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par de faibles variations, délibérées, de facteurs associés à la procédure et elle donne une indication de la fiabilité de la procédure dans les conditions normales d'application (Hubert *et al.*, 2007).

8. La limite de détection

C'est la plus faible quantité d'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure (Hubert *et al.*, 2007).

9. La limite de quantification

Elle exprime la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude (justesse + fidélité) définie. Elle n'a donc de sens que si l'exactitude de la méthode a bien été démontrée (Beloufa *et al.*, 2017).

10. La sensibilité

C'est le rapport de la variation de la réponse de la méthode d'analyse à la variation de la quantité d'analyte. Une procédure est donc dite sensible si une faible variation de la concentration ou de la quantité d'analyte entraîne une variation significative de la réponse (Bouadibi, 2014).

11. Intervalle de dosage

C'est la région entre les niveaux supérieur et inférieur (ces valeurs incluses) pour laquelle il a été démontré que la procédure est appropriée quant à son exactitude (justesse + fidélité) et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite (Bouadibi, 2014).

II.3.4. Utilisation en routine

Au cas où la validation démontre bien que la méthode est suffisamment exacte et fournit des résultats proches de la vérité, il va s'en suivre l'étape de l'utilisation en routine. Bien que la méthode soit validée, elle doit être contrôlée tout au long de son utilisation afin de s'assurer qu'elle continue à fonctionner de façon satisfaisante (Bouadibi, 2014). Les connaissances acquises lors du développement et de la validation de la méthode ainsi que des outils spécifiques qui sont les cartes de contrôle et les essais d'aptitude sont nécessaires pour effectuer ce contrôle (Feinberg, 2009 ; Rozet, 2008). La méthode classique pour vérifier la fiabilité d'un système consiste à répéter l'analyse d'un échantillon de référence à intervalles réguliers et de le surveiller avec les techniques de maîtrise statistique des procédés (Rius *et al.*, 1998 ; Doerffel *et al.*, 1991 ; Kringle, 1994 ; Doerffel *et al.*, 1994 ; Bouadibi, 2014).

Au cours de l'utilisation d'une méthode en routine, il s'avère quelquefois nécessaire d'y apporter des modifications. Dans ce cas, une nouvelle optimisation, une revalidation partielle, ou même une validation complète de la méthode optimisée doit être envisagée (Hubert, 2015). Dans d'autres cas, une comparaison entre les performances de la méthode initiale et de la méthode optimisée peut s'avérer suffisante et ainsi permettre d'éviter la réalisation d'une nouvelle validation, qu'elle soit partielle ou complète. Ces comparaisons se basent sur une démonstration statistique de l'équivalence entre deux méthodes (Dewé, 2009 ; Borman *et al*, 2009 ; Hubert, 2015). Une fois les performances de la méthode optimisée démontrées, celle-ci peut alors perdurer et son utilisation en routine peut, dès lors, reprendre jusqu'à ce que l'analyste soit éventuellement obligé d'abandonner cette méthode pour, par exemple, intégrer une autre technique permettant de répondre à des problématiques toujours plus complexes et des niveaux d'exigences toujours plus grands (Hubert, 2015).

II.4. TESTS DE PHARMACOTECHNIE

La qualité et l'efficacité d'un médicament ne reposent pas toujours sur une quantité correcte en principe actif. Il existe d'autres paramètres qui peuvent influencer sur l'effet pharmacologique attendu du médicament. En effet, le médicament peut bien contenir le principe actif en quantité correcte tel que déclarée par le fabricant mais il peut arriver que la substance active ne parvienne pas à se mettre à la disposition de l'organisme pour pouvoir fournir la réponse thérapeutique du médicament. C'est dans ce contexte que les tests de la pharmacotechnie (test de dureté, friabilité, de désintégration etc.) occupent aussi une place importante dans le contrôle qualité des médicaments (Koissi, 2008).

II.4.1. Dureté des comprimés

Elle est destinée à déterminer, dans des conditions définies, la résistance à la rupture des comprimés, par la mesure de l'intensité de la force qui leur est diamétralement appliquée pour provoquer leur rupture par écrasement (Pharmacopée Européenne, 2016). La dureté des comprimés est un paramètre qui influence la désagrégation des comprimés, en industrie, elle doit être contrôlée à intervalle de temps régulier au cours de la compression si nécessaire (Lehir, 2001).

L'appareil de dureté est constitué de deux mâchoires se faisant face (figure 4), l'une se déplaçant vers l'autre. La surface plane des mâchoires est perpendiculaire au sens du déplacement. La surface d'écrasement des mâchoires est plane et plus grande que la zone de contact avec le comprimé. L'appareil est étalonné à l'aide d'un système précis à 1 newton près (Pharmacopée Européenne, 2016).



Figure 4. Appareil de dureté du Laboratoire de Galénique et Analyse des médicaments de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques/Université de Lubumbashi. (Nom de la marque : Distek-DF-2F ; Fabricant : Distek, Inc., Ville : North Brunswick, pays : Etats-Unis (Photo Mwamba).

II.4.2. Friabilité des comprimés

La mesure de la friabilité complète d'autres mesures de résistance mécanique, par exemple celle de la dureté des comprimés. Elle est effectuée exclusivement sur les comprimés non enrobés en vue de s'assurer que ces derniers présentent une résistance mécanique suffisante, pour que leurs surfaces ne soit pas endommagées ou ne présentent pas des signes d'abrasion ou de rupture, sous l'effet de toutes les manipulations (chocs mécaniques, frottements, attrition) qu'ils vont subir jusqu'au moment de leur utilisation (Koissi, 2008).

Le friabilimètre (figure 5) est généralement constitué d'un ou deux tambours d'un diamètre intérieur de 283-291 mm et d'une profondeur de 36-40 mm, en polymère synthétique transparent à surfaces intérieures polies, et produisant le moins possible d'électricité statique. L'une des faces du tambour est amovible. A chaque rotation, les comprimés sont projetés du centre du tambour vers la paroi extérieure, par une pale curviligne de rayon intérieur de 75,5-

85,5 mm. Le diamètre extérieur de l'anneau central est de 24,5-25,5 mm. Le tambour est monté sur l'axe horizontal d'un dispositif d'entraînement dont la vitesse de rotation est de 25 ± 1 tr/min. Par conséquent, à chaque rotation, les comprimés roulent ou glissent et tombent sur la paroi ou les uns sur les autres (Pharmacopée Européenne, 2016).



Figure 5. Appareil de friabilité du Laboratoire de Galénique et Analyse des médicaments de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques/Université de Lubumbashi. (Nom de la marque : Distek-DF-2F ; Fabricant : Distek, Inc., Ville : North Brunswick, pays : Etats-Unis (Photo Mwamba).

II.4.3. Désagrégation des comprimés

Cet essai est destiné à déterminer l'aptitude des comprimés ou capsules à se désagréger dans un temps prescrit, en milieu liquide et dans les conditions expérimentales bien définies (Pharmacopée Européenne, 2016).

La désagrégation n'implique pas une dissolution complète de l'unité soumise à l'essai ni même de son composant actif. Par définition la désagrégation est complète, lorsque tout résidu, à l'exception de fragments insolubles d'enrobage ou d'enveloppe de capsule, pouvant subsister sur la grille de l'appareil ou adhérer à la face inférieure du disque, si l'on en a utilisé un, est constitué d'une masse molle ne comportant pas de noyau palpable (Pharmacopée Européenne, 2016).

L'appareil de désagrégation se compose d'un panier porte-tubes ayant six tubes cylindriques, d'un vase cylindrique bas de 1 litre destiné à contenir le liquide d'immersion, d'une hauteur de 149 ± 11 mm et d'un diamètre intérieur de 106 ± 9 mm, d'un système thermostatique permettant

de maintenir le liquide à une température comprise entre 35-39 °C, et d'un dispositif servant à imprimer au porte-tubes (figure 6), dans le liquide d'immersion, un mouvement vertical alternatif de fréquence constante comprise entre 29-32 cycles par minute de montée-descente et d'amplitude de 55 ± 2 mm. Le volume de liquide introduit dans le vase est ajusté pour que le treillis métallique soit, en haut de course, à au moins 15 mm de la surface du liquide et, en bas de course, à au moins 25 mm du fond du vase. A aucun moment le haut du panier ne doit être submergé. Les temps de montée et de descente sont égaux, et le changement de sens s'effectue selon une transition progressive plutôt qu'une inversion brutale. Le porte-tubes suit un mouvement vertical suivant son axe, sans mouvement horizontal appréciable ni déviation significative par rapport à la verticale (Pharmacopée Européenne, 2016).



Figure 6. Appareil de désagrégation du Laboratoire de Galénique et Analyse des médicaments de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques/Université de Lubumbashi. (Nom de la marque : Distek-DF-2F ; Fabricant : Distek, Inc., Ville : North Brunswick, pays : Etats-Unis).

II.4.4. Dissolution des comprimés

Le test de dissolution renseigne sur la rapidité avec laquelle une substance médicamenteuse donnée est libérée de sa forme galénique, dans un milieu liquide déterminé (Aiache, 1997). Cette mesure réalisable *in vitro* s'est imposée comme une nécessité tant au niveau de la formulation que lors du contrôle de la production (Benzina *et al*, 1983 ; Thomas, 1999; Ba *et al*, 2009 ; Kalonji, 2012).

Il y a quelques années, le test de dissolution du principe actif était étudiée *in vitro* simplement par la détermination du temps de désagrégation de la forme pharmaceutique dans l'eau ou dans les liquides gastriques artificiels. Or, pour être absorbé, le principe actif doit être dissous (Aiache *et al*, 1983). Le test de dissolution a donc dû suppléer le test de désagrégation.

Ainsi, le test de dissolution est considéré comme une méthode d'étude indirecte de la biodisponibilité préconisée, pour une multitude des formes pharmaceutiques solides (Thomas, 1999, Ba *et al*, 2005).

L'appareil est composé des éléments suivants (Kalonji, 2012) :

- Un récipient qui peut être couvert, en verre ou autre matériau transparent inerte ;
- Un moteur
- Un agitateur constitué d'une tige servant d'axe moteur et d'un panier cylindrique.

Le récipient est partiellement immergé dans un bain d'eau thermostaté de taille appropriée ou chauffé par un dispositif approprié tel un chauffe-ballon (figure 7). Le bain d'eau ou le dispositif chauffant permet de maintenir à l'intérieur du récipient une température de $37 \pm 0,5$ °C et d'assurer un mouvement fluide et constant du milieu de dissolution. Aucune des parties de l'appareillage, ni l'environnement dans lequel il est placé, ne génèrent de mouvement, agitation ou vibration significatifs autres que ceux dus à la rotation régulière de l'agitateur (Pharmacopée Européenne, 2016).



Figure 7. Appareil de dissolution du Laboratoire de Galénique et Analyse des médicaments de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques/Université de Lubumbashi. (Nom de la marque : Distek-25001 ; Fabricant : Distek, Inc., Ville : North Brunswick, pays : Etats-Unis (Photo Mwamba).

En conclusion, la qualité d'un produit de santé est primordiale pour garantir la sécurité du patient à qui ce produit est finalement destiné. Cette qualité doit être un souci majeur qui doit animer tous les acteurs pour aboutir à cet objectif ; d'apporter un traitement adéquat à une pathologie donnée.

Le deuxième chapitre de ce travail a passé en revue quelques notions relatives aux méthodes d'analyse de médicaments ainsi que la mise au point des méthodes analytiques. Une méthode analytique doit être performante pour pouvoir fournir des résultats fiables. En effet, derrière la décision qui découlera de la méthode analytique utilisée, les conséquences néfastes peuvent se répercuter sur la santé de la population ; si un médicament potentiellement dangereux pour la santé s'avérait déclaré conforme. Un laboratoire de contrôle de qualité des médicaments doit alors veiller à ce que toutes les méthodes utilisées pour contrôler la qualité des médicaments soient validées, ou tirées de monographies. C'est dans ce contexte que les documents normatifs (ISO 17025, FDA, EMA) et les réglementations en rapport avec les bonnes pratiques de laboratoires (BPL), de fabrication (BPF), etc. suggèrent que toutes les procédures de dosage doivent répondre à une série de critères d'acceptabilité.

CHAPITRE III. PHARMACOLOGIE DES ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques se définissent comme des substances, d'origine naturelle ou synthétique, utilisée contre les infections causées par les bactéries. Ils sont caractérisés par différents modes de fonctionnement (Moss *et al.*, 2015 ; Sadarangani *et al.*, 2015). Certains attaquent la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne, ce qui entraîne une déstabilisation de la bactérie et sa mort, un effet "bactéricide". D'autres agissent sur le système de synthèse protéique de la bactérie en se fixant sur la sous unité 50s ou 30s du ribosome bactérien, ils entraînent une inhibition de la synthèse protéique. Dans ce dernier cas, la bactérie ne peut plus se développer ni se multiplier, on parle de l'effet bactériostatique (Moss *et al.*, 2015 ; Sadarangani *et al.*, 2015).

III.1. MÉCANISMES D'ACTION

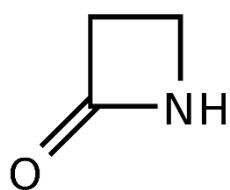
De manière générale, quatre mécanismes d'action des antibiotiques peuvent être évoqués (Javan *et al.*, 2015; Karlowsky *et al.*, 2015) (Jun *et al.*, 2015 ; Karlowsky *et al.*, 2015 ; Poehlgard et Douthwaite, 2005 ; Gunther *et al.*, 2015 ; Bruton *et al.*, 2006) :

- Action sur la paroi membranaire ;
- Action sur la synthèse protéique ;
- Action sur les voies métaboliques et l'ADN ;
- Anti-anaérobies.

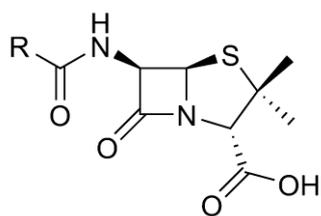
III.1.1. Action sur la paroi bactérienne

Les antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne sont des inhibiteurs de la transpeptidase, responsable de la catalyse de la transpeptidation, une des étapes nécessaires à la réticulation du peptidoglycane (Segura, 2009 ; Jun *et al.*, 2015). Les antibiotiques ayant ce mode d'action présentent une analogie de structure avec les précurseurs du peptidoglycane (dipeptide terminal D-Ala-D-Ala). Ils se fixent sur le site actif des protéines liant les pénicillines (PLP) sur le mode d'un substrat suicide conduisant à l'arrêt de synthèse du peptidoglycane (Segura, 2009 ; Jun *et al.*, 2015).

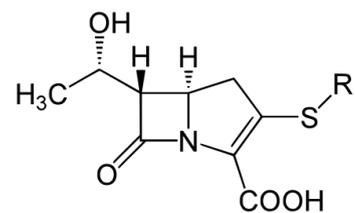
Les antibiotiques concernés par ce mode d'action sont les pénicillines (**Ib**), les céphalosporines, les glycopeptides (**IIa**), les carbapénèmes (**Ic**) et le monobactame (**Ia**) (Suard, 2007 ; Jun *et al.*, 2015 ; Karlowsky *et al.*, 2015 ; Verdier, 2018).



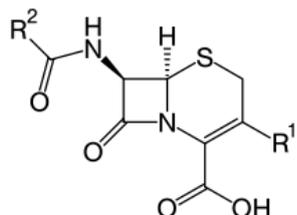
Bêtalactame (Ia)



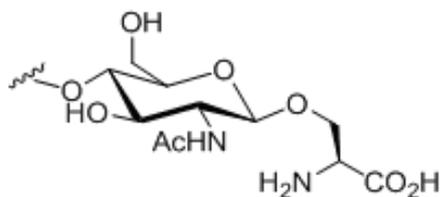
Pénicilline (Ib)



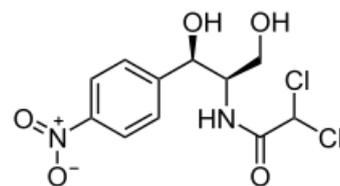
Carbapénème (Ic)



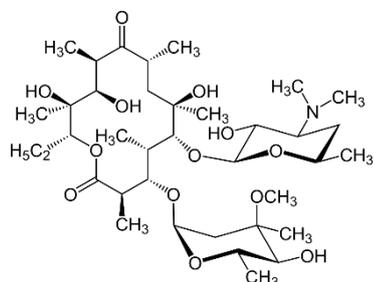
Céphalosporine (Id)



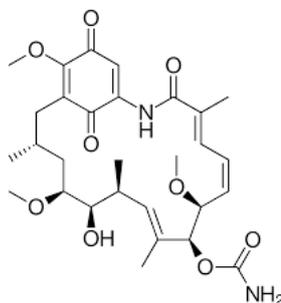
Glycopeptide (IIa)



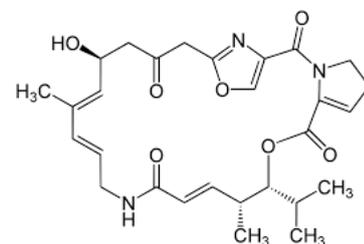
Phénicolé (IIIa)



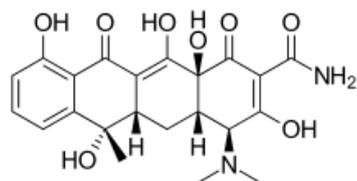
Macrolide (IVa)



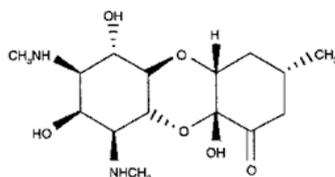
Lincosamide (IVb)



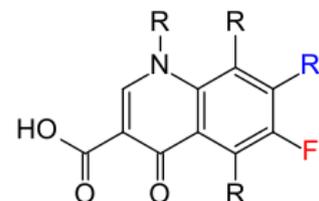
Streptogramines (IVc)



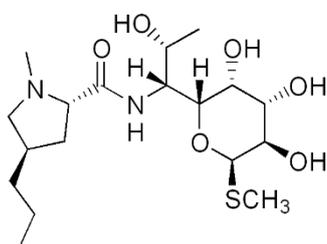
Tétracycline (V)



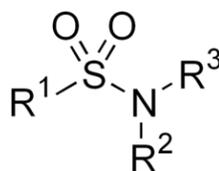
Aminoside (VI)



Quinolone (VII)



Ansamycine (VIII)



Sulfamidé (IX)

III.1.2. Action sur la synthèse protéique

Les ribosomes procaryotes ne sont pas constitués de mêmes protéines que les ribosomes eucaryotes, et ont des coefficients de sédimentation différents [70S pour les ribosomes procaryotes (50S pour la sous-unité lourde et 30S pour la sous-unité légère) et 80S pour les ribosomes eucaryotes (60S pour la sous-unité lourde et 40S pour la sous-unité légère)]. Les antibiotiques ayant cette action agissent au niveau (Poehlgaard et Douthwaite, 2005):

- de la sous-unité 50S, empêchant la fixation d'un nouvel acide aminé sur la chaîne en croissance (phénicolés **IIIa**) ou le transfert de la chaîne en croissance du site A vers le site P (macrolides **IVa**, lincosamides **IVb**, streptogramines **IVc**).
- de la sous-unité 30S, qui empêchent ou perturbent la liaison des aminoacyl-ARNt aux ribosomes (tétracyclines **V**, aminoglycosides **VI**).

III.1.3. Action sur les voies métaboliques

Ces antibiotiques agissent sur la synthèse des ADN et des ARN ou de leurs précurseurs.

Le mécanisme de fonctionnement des quinolones consiste en leur capacité à traverser la paroi cellulaire des bactéries pour inhiber la synthèse de l'ADN. Elles inhibent l'action de l'ADN gyrase qui est une enzyme topoisomérase (Gunther *et al.*, 2015). Cette inhibition est basée sur la formation d'un complexe ternaire composé de la quinolone, de l'ADN et de la topoisomérase (Segura., 2009 ; Gunther *et al.*, 2015). Ce complexe perturbe les fonctions de base de l'ADN, telles que la transcription, la réplication et la réparation, ce qui entraîne la mort cellulaire (Segura, 2009).

Les ansamycines **VIII** inhibent spécifiquement l'ARN polymérase de *Mycobacterium tuberculosis* qui permet la transcription de l'information issue de l'ADN sur l'ARN messager (Yu *et al.*, 2013).

Certains sulfamidés **IX** agissent sur la synthèse de l'acide folique, un cofacteur de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques à incorporer dans les acides nucléiques. Leur spécificité d'action provient du fait que les eucaryotes ne synthétisent pas d'acide folique. Les diaminopyridines inhibent la réduction de l'acide folique en tirant parti de la haute sensibilité de la dihydrofolate réductase bactérienne (Moulin et Coquerel, 2007).

III.1.4. Les anti-anaérobies

Nous retrouvons dans ce groupe les 5- nitroimidazolés, des dérivés semi-synthétiques de l'azomycine produite par les *Streptomyces*. Leur action antibactérienne a été découverte fortuitement, car les dérivés de l'imidazole étaient avant tout considérés comme antiparasitaires (Moulin et Coquerel, 2007). En réalité, les 5-nitroimidazoles sont spécifiquement dirigés contre les organismes anaérobies, y compris protozoaires. Ils sont souvent utilisés en association avec d'autres antibiotiques pour éliminer les germes anaérobies potentiellement présents (Bruton *et al.*, 2006). Après leur pénétration dans la bactérie par simple diffusion, l'antibiotique est activé par réduction de son groupement nitro. Cette réduction n'a lieu que chez les bactéries anaérobies (mais également chez quelques rares espèces micro-aérophiles telles que l'*Helicobacter pylori*). La réduction du NO₂ du nitro-imidazole s'opère préférentiellement à celle des coenzymes bactériens (NAD⁺ et NADP⁺), conduisant à une diminution du stock de co-enzymes réduits importants pour le métabolisme de la bactérie. Par ailleurs, certains des radicaux libres et produits intermédiaires sont très réactifs et, dès lors, susceptibles de causer directement des dommages à l'ADN (Bruton *et al.*, 2006).

Bien qu'il vient d'être montré que les bactéries sont inhibées ou tuées par les différents mécanismes d'action des antibiotiques décrits ci-haut, il y a de plus en plus d'échecs thérapeutiques dûs principalement à l'émergence de résistance aux antibiotiques censés éradiquer les germes pathogènes (Costelloe *et al.*, 2010; Nwokike *et al.*, 2018; Tadesse *et al.*, 2017). Le décès dû à la résistance sont estimée à 700 000 décès par an et le développement des souches bactériennes résistantes devrait entraîner 10 millions de victimes par an d'ici 2050 (Tadesse *et al.*, 2017). De plus, ce problème de résistance aux antibiotiques concerne tous les pays du monde car les souches bactériennes résistantes ne tiennent pas compte des frontières. L'émergence de cette résistance peut être favorisée par (i) une utilisation abusive des antibiotiques (le non-respect de l'observance et la non-adhérence au traitement instauré) ; (ii) le fait que les antibiotiques utilisés sont de qualité douteuse ; (iii) le choix empirique des antibiotiques pour traiter les infections alors que le germe est résistant à l'antibiotique choisi (Butt *et al.*, 2017; Delepierre *et al.*, 2012). Ces trois facteurs sont surtout répandus dans les pays en développement (Ceyhan *et al.*, 2010; Kelesidis et Falagas, 2015; Ostrowsky *et al.*, 2018). Au regard de différentes conséquences que peut engendrer la résistance aux antibiotiques, il convient d'aborder les mécanismes de survenue de résistance.

III.2. MÉCANISME DE RÉSISTANCE

La résistance aux antibiotiques survient lorsqu'un médicament ne parvient pas à éradiquer une maladie infectieuse donnée. Cette résistance peut être naturelle (intrinsèque) ou acquise. Elle est dite intrinsèque lorsqu'une bactérie est héréditairement résistante à un antibiotique ou lorsqu'une caractéristique fonctionnelle ou structurelle confère une certaine tolérance, voire une insensibilité totale, à tous les membres d'un groupe de bactéries, vis-à-vis d'une molécule particulière ou vis-à-vis d'une classe d'antimicrobiens. L'absence ou la réduction de sensibilité d'une bactérie à l'égard d'un antibiotique peut être due à (Roberts *et al.*, 2008 ; Muylaert et Mainil, 2012; Verdier, 2018 : (i) un manque d'affinité de l'antibiotique pour la cible bactérienne ; (ii) une inaccessibilité de la molécule à la cellule bactérienne ; (iii) une expulsion de l'antibiotique par des pompes à efflux ; (iv) une inactivation enzymatique innée de l'antibiotique).

En revanche, la résistance acquise survient suite à une antibiothérapie. En effet, la bactérie finit par développer des résistances contre les antibiotiques auxquels elle était sensible (Ayele *et al.*, 2018 ; Costelloe *et al.*, 2010 ; Nwokike *et al.*, 2018; Ostrowsky *et al.*, 2018; Tadesse *et al.*, 2017). Il est rapporté que ce mode de résistance est dû soit à la mutation du patrimoine génétique de la bactérie, soit à l'acquisition, d'un plasmide (Liu *et al.*, 2016). C'est entre autres le cas de la prise en charge des infections urinaires qui étaient traitées avec succès en utilisant la colistine. Des études ont pu démontrer l'émergence du mécanisme de résistance à la colistine par l'intermédiaire d'un plasmide MCR-1 (Liu *et al.*, 2016; McGann *et al.*, 2016; Mediavilla *et al.*, 2016).

Il importe de souligner que, en conditions *in vivo*, la capacité de résistance ou de sensibilité de la souche bactérienne à l'antibiothérapie mise en place sera dépendante de différents paramètres, tels que la localisation de la bactérie, le dosage et le mode d'administration de l'antibiotique, et l'état du système immunitaire de l'individu traité (Muylaert et Mainil, 2012). L'efficacité d'un antibiotique résulte du rapport entre la concentration de la molécule active obtenue au niveau du site d'action et la sensibilité du micro-organisme à cette molécule. Cette sensibilité est évaluée *in vitro* par la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI), de la concentration minimale efficace (CME), ou de la concentration inhibant 50% de la réplication (IC50) (Verdier, 2018 ; O'Neill, 2016 ; Founou *et al.*, 2017).

III.2.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

C'est le mode de résistance le plus courant pour les antibiotiques d'origine naturelle tels que les bêta-lactames (penicillines, céphalosporines et carbapénème), les aminoglycosides (kanamycine, tobramycine, amikacine), les phénicolés (chloramphénicol) et les macrolides (erythromycine) (Nikaido, 2009 ; Muylaert et Mainil, 2012).

Les β -lactamases qui inactivent le cycle bêta-lactame sont subdivisées en quatre classes (Bambeke et Tulkens, 2008 ; Nikaido, 2009) :

- Classe A : enzymes caractérisées par la présence d'une sérine dans leur site actif, qui dégradent préférentiellement les pénicillines. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique.
- Classe B : métallo-enzymes qui ne sont actives qu'en présence de Zn^{2+} . Ils hydrolysent principalement les carbapénèmes.
- Classe C : enzymes présentant surtout une activité sur les céphalosporines. Elles ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique.
- Classe D : enzymes agissant principalement sur les pénicillines ; elles sont variablement inhibées par l'acide clavulanique.

Les aminoglycosides sont inactivés par des modifications qui réduisent les charges positives sur ces antibiotiques polycationiques. Il existe trois principales enzymes inactivant les aminoglycosides : les acétyltransférases (inactivent la gentamycine et l'amikacine), les nucléotidyltransférases (altèrent l'activité de la tobramycine), les phosphotransférases (affectent l'amikacine). Plusieurs enzymes distinctes peuvent inactiver une même position sur la molécule d'aminoglycoside, et une même bactérie peut posséder les gènes codant pour plusieurs enzymes (Nikado, 2009) (Alekhun et Levy, 2007). La chloramphénicol-acétyltransferase confère la résistance des Gram (+) et (-) au chloramphénicol. Mais l'impact de ce type de résistance est faible (Nikado, 2009 ; Founou *et al.*, 2017).

III.2.2. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique

La cible de l'antibiotique peut être structurellement modifiée ou remplacée, de telle sorte que l'antibiotique ne puisse plus se lier et exercer son activité au niveau de la bactérie (Muylaert et Mainil, 2012). La modification peut s'opérer à trois niveaux (Alekhun et Levy, 2007 ; Holmes *et al.*, 2016):

- Au niveau de l'enzyme cible : L'exemple le plus connu de ce type de résistance est constitué par les MRSA (*Methicillin Resistant S. aureus*), souvent rencontré avec les

antibiotiques appartenant aux bêta-lactames. Il y a une altération des PBP (*Penicillin Bounding Protein*) qui entraîne la réduction de l'affinité pour les antibiotiques. Ce mode de résistance implique la production d'une PBP2a de faible affinité pour ces antibiotiques ; ce qui entraîne une résistance à l'ensemble de la classe des bêta-lactames et a donc une grande signification clinique. Ce type de résistance s'observe aussi avec les sulfamidés (production de dihydrofolate reductase modifiée qui ne lie plus l'antibiotique) et les fluoroquinolones (mutation de l'ADN gyrase empêchant la formation du complexe ternaire fluoroquinilone-gyrase-ADN).

- Au niveau de la cible ribosomiale : ce type de résistance concerne les antibiotiques qui agissent par inhibition de la synthèse protéique de la bactérie. Le mécanisme de résistance se situe au niveau de la sous-unité 30S où une mutation confère la résistance à la streptomycine. Au niveau de la sous-unité 50S une méthylation qui donne lieu à une résistance croisée aux macrolides, lincosamides et streptogramines.
- Au niveau des précurseurs de la paroi : Cette résistance est surtout rencontrée avec la vancomycine. En effet, l'extrémité D-Ala-D-Ala du peptidoglycane est substituée par D-Ala-D-Lac à laquelle la vancomycine ne se lie pas.

III.2.3. Modification de la concentration de l'antibiotique dans la bactérie

Deux mécanismes de résistance sont possibles à ce niveau :

III.2.3.1. Altération des membranes bactériennes

Ce type de résistance est uniquement observé chez les bactéries à Gram-négatif de par la différence qui existe au niveau de la composition des parois cellulaires entre les bactéries à Gram-positif et négatif. Les bactéries à Gram-positif ont un polymère de peptidoglycane mince, très proche de la surface cellulaire, ce qui permet à l'antibiotique de pénétrer facilement dans la cellule (Nikaido, 2009 ; Mary *et al.*, 2011). La situation est différente avec les bactéries à Gram-négatifs, qui contiennent une membrane externe constituée de lipo-polysaccharide agissant comme une barrière aux composés hydrophobes en général et aux composés hydrophiles qui dépassent un certain poids moléculaire. Cette membrane externe agit donc comme une barrière impénétrable à certains antibiotiques. Cependant, les antibiotiques hydrophiles de faible poids moléculaire peuvent diffuser à travers des canaux aqueux dans la membrane externe qui est formée de protéines appelées porines (Nikaido, 2009 ; Mary *et al.*, 2011). Les classes concernées par ce mécanisme de résistance sont : les bêta-lactames principalement, mais aussi les aminoglycosides, le chloramphénicol ou les quinolones.

III.2.4. Pompes à efflux

Ce mécanisme de résistance, qui nécessite de l'énergie, est caractérisé par une réduction de l'accumulation de l'antibiotique dans le cytoplasme de la bactérie suite à l'expression d'un transporteur actif qui expulse l'antibiotique (Holmes *et al.*, 2016; Muylaert et Mainil, 2012). Il a été décrit pour la première fois avec les tétracyclines puis pour plusieurs classes, notamment les fluoroquinolones, les bêta-lactames, les macrolides, les sulfamidés, les aminoglycosides... Ces pompes sont particulièrement présentes chez les bactéries à Gram-négatif, comme le *Pseudomonas aeruginosa* (Bambeke et Tulkens, 2008)

Ces pompes à efflux ont généralement une spécificité de substrats assez large et seulement certaines d'entre-elles confèrent une résistance aux antibiotiques. Ils sont classés sur base notamment de leur spécificité de substrats et de la source d'énergie employée sous forme d'ATPase. Certains de ces transporteurs sont très spécifiques, les pompes SDR (*specific drug resistance*), alors que d'autres agissent sur une multitude de molécules, les pompes MDR (*multiple drug resistance*). Les pompes SDR sont les plus incriminées dans la survenue des résistances observées vis-à-vis des tétracyclines, macrolides, lincosamides et phénicolés. Par contre, les pompes MDR présentent un bas niveau de résistance et sont classées en deux groupes (i) celles qui sont les transporteurs ABC (ATP-binding cassette) utilisent l'énergie par l'hydrolyse de l'ATP et sont spécifiques pour les macrolides, lincosamides et streptogramines et (ii) celles qui sont les transporteurs appelés secondaires, utilisant un gradient électrochimique transmembranaire de protons ou d'ions sodium pour expulser la molécule à l'extérieur de la cellule, elles sont responsables de résistances multiples aux antibiotiques (Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Muylaert et Mainil, 2012).

III.2.5. Protection de la cible antibiotique

La protection de la cible de l'antibiotique est un type de résistance très rencontrés dans la famille des tétracyclines. Ce mécanisme de résistance se base sur un gène qui code pour une protéine cytoplasmique, qui interagit avec le ribosome, le rendant ainsi insensible à la tétracycline (Mary *et al.*, 2011). Les principales protéines de protection ribosomiale sont Tet (M), Tet (O) et Tet (Q). Il est rapporté dans la littérature que Tet (M) est retrouvée dans plusieurs espèces bactériennes : *Streptococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Mycoplasma*, *Bacteroides* et *Staphylococcus*. Tet (O) est présente chez *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Mobiluncus spp* et *campylobacter*, alors que Tet (Q) est retrouvé chez les espèces de Bactéroïdes et Prevotella (Gerbaud et Courvalin, 1993 ; Mary *et al.*, 2011 ; Nikolich *et al.*, 1992).

Ces protéines déplacent les tétracyclines de leur site de fixation par la création d'un encombrement stérique au niveau du ribosome (Bambeke et Tulkens, 2008 ; Muylaert et Mainil, 2012). Burdett (1991) a purifié pour la première fois l'une des protéines de résistance responsable de la protection des ribosomes Tet (M) et a montré qu'elle pouvait se lier aux ribosomes pour empêcher la fixation de tétracycline (Burdett, 1991). Egalement, une résistance aux fluoroquinolones médiée par la production de protéines dont la structure tertiaire mime celle de l'ADN, déplaçant les fluoroquinolones de leur liaison à l'acide nucléique (Bambeke et Tulkens, 2008).

III.2.6. Piégeage de l'antibiotique

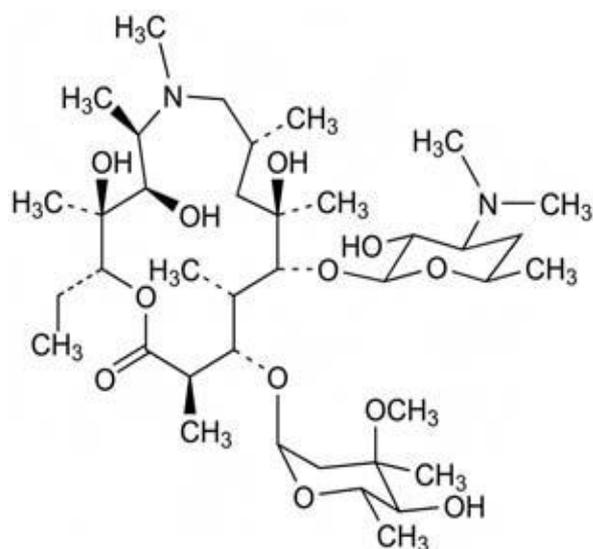
Les bactéries sont capables de piéger un antibiotique en augmentant la production de sa cible ou en produisant une autre molécule possédant une grande affinité pour celui-ci. Il en résulte une diminution de la concentration de l'antibiotique libre au niveau de la cible. Ainsi des mutations chromosomiques responsables d'une surproduction des cibles des sulfamidés et du triméthoprim ont été décrites chez de nombreuses espèces bactériennes. Ce mécanisme est également impliqué dans de faibles niveaux d'efficacité des glycopeptides chez certaines souches de *S. aureus* et à la tobramycine chez *E. coli* (Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Muylaert et Mainil, 2012).

III.3. SPECIFICITES PHARMACOLOGIQUES DES MOLECULES SELECTIONNEES

Dans ce point, nous rassemblons quelques données de la littérature en rapport avec les substances actives étudiées dans ce travail.

III.3.1. Azithromycine et érythromycine

L'azithromycine et l'érythromycine sont des antibiotiques dérivés de la fermentation de *Saccharomyces erythrae*. L'azithromycine se présente sous forme d'une poudre blanche ou sensiblement blanche. L'érythromycine est une poudre blanche à faiblement jaune ou cristaux incolores à faiblement jaune, faiblement hygroscopique. Ces deux macrolides sont très légèrement solubles dans l'eau, facilement solubles dans le méthanol, l'éthanol anhydre et dans le chlorure de méthylène (Moffat *et al.*, 2011 ; Pharmacopée Européenne, 2016).



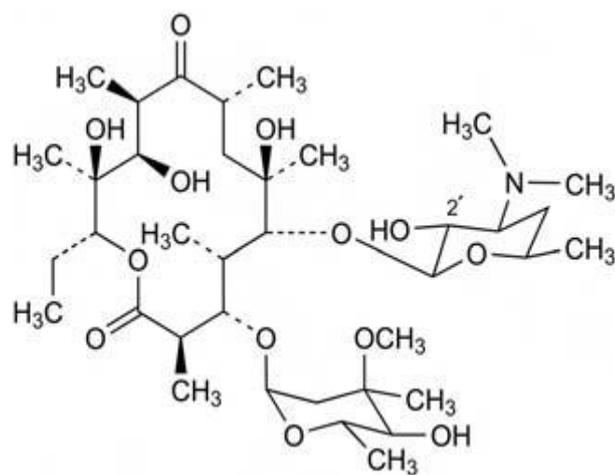
Azithromycine

Formule brute : $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$

Masse molaire : $749,0 \text{ g mol}^{-1}$

pKa : 8,1 et 8.8

log P: 4,2



Érythromycine

Formule brute : $C_{37}H_{67}NO_{13}$

Masse molaire : $733,9 \text{ g mol}^{-1}$

pKa : 8,9

log P: 2,7

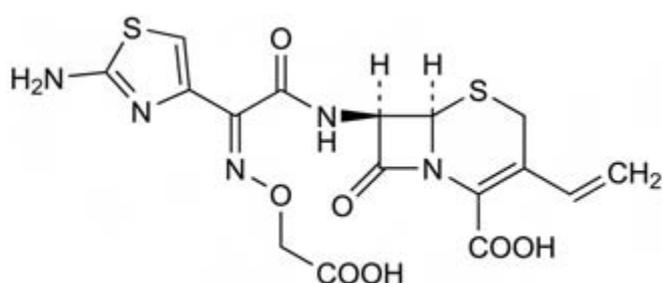
L'azithromycine est rapidement absorbée après administration orale avec une biodisponibilité d'environ 40 % alors que l'érythromycine est moins biodisponible par la dégradation du macrocycle dans le milieu acide de l'estomac. Pour remédier à cet inconvénient, des esters d'érythromycine, plus résistants à l'acidité et susceptibles de régénérer l'antibiotique actif sont utilisés (Bambeke et Tulkens, 2008 ; Moffat *et al.*, 2011). Ils diffusent largement dans tous les tissus de l'organisme, à l'exception du liquide céphalorachidien. Leur accumulation

intracellulaire en fait des antibiotiques de choix dans le traitement des infections à germes intracellulaires. Ils sont métabolisés par le foie et subissent une élimination biliaire.

Azithromycine et érythromycine constituent un traitement de choix des infections pulmonaires atypiques causées par *Legionella*, *Mycoplasma* et *Chlamydia spp.* Ils sont préconisés dans le traitement des infections respiratoires, des infections sexuellement transmissibles, des infections du tractus digestif à *Helicobacter pylori* et *Campylobacter Jejuni* et des infections de la peau et des tissus mous (Breier *et al.*, 2002 ; Bambeke et Tulkens, 2008 ; Nagaraju et Chowdary, 2018).

III.3.2. Céfadroxil et céfixime

Céfadroxil et céfixime sont des molécules antibiotiques bêta-lactamines de la classe des céphalosporines. Le céfadroxyl appartient aux céphalosporines de première génération et le céfixime appartient à la troisième génération. Ces deux céphalosporines sont des poudres blanches ou sensiblement blanches, peu solubles dans l'eau. Le céfadroxil est peu soluble dans l'éthanol à 96 % alors que le céfixime est soluble dans le méthanol et acétone, assez soluble dans l'éthanol anhydre et pratiquement insoluble dans l'acétate d'éthyle (Pharmacopée Européenne, 2016).



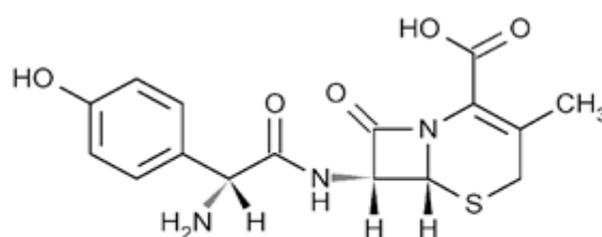
Céfixime

Formule brute : $C_{16}H_{15}N_5O_7S_2$

Masse molaire : 453,5 gmol⁻¹

pKa : 3,73

log P : - 0,4



Céfadroxil

Formule brute : $C_{16}H_{15}N_5O_7S_2$

Masse molaire : 363,4 gmol⁻¹

pKa : 3,45

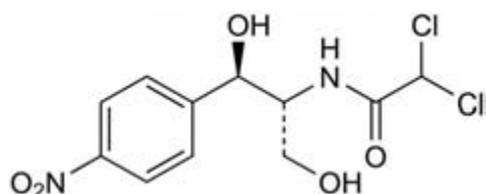
log P : - 0,4

De par leur mauvaise résorption dans le tube digestif, les céphalosporines sont pour la plupart administrées par voie parentérale ; le céfadroxil fait cependant partie des céphalosporines les mieux absorbés par voie orale. S'agissant du céfixime, 40 à 50 % de la dose sont lentement absorbés par voie orale (Moffat *et al.*, 2011 ; Bambeke et Tulkens, 2008). Les deux céphalosporines diffusent bien dans l'organisme, mais ne se concentrent pas dans les tissus. Ils passent la barrière hémato-encéphalique, même si celle-ci n'est pas enflammée. La métabolisation est hépatique et l'élimination s'effectue par voie rénale.

Le céfadroxyl est préconisé dans le traitement des infections graves à Gram (+) sensibles, telles que des infections ORL à streptocoques et des infections respiratoires et urinaires. Les formes à usage oral de céfadroxyl représentent des alternatives à l'ampicilline et à l'amoxicilline. Quant au céfixime, il est réservé au traitement des infections sévères à Gram (-) et reste en principe actif sur des germes multi-résistants (Bambeke et Tulkens, 2008).

III.3.3. Chloramphénicol

Le chloramphénicol est un antibiotique appartenant à la famille des phénicolés, potentiellement utiles en raison de leur large spectre et de leur bonne pénétration dans le système nerveux central. Il se présente sous forme d'une poudre fine, cristalline, blanche à blanc grisâtre ou blanc jaunâtre ou de cristaux fins aiguilles, ou de cristaux plats allongés peu soluble dans l'eau. Il est facilement soluble dans l'alcool et le propylène glycol (Pharmacopée Européenne, 2016).



Chloramphénicol

Masse molaire : 323,1 g mol⁻¹

pKa : 5,5

log P : 1,1

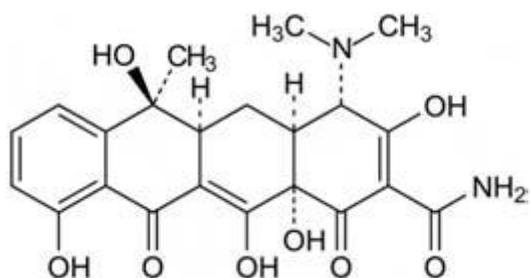
Le chloramphénicol est généralement administré sous forme de prodrogue esters (palmitate par voie orale et succinate par voie parentérale). L'ester est facilement absorbé une fois administré par voie orale et diffuse mieux dans les tissus de l'organisme grâce à son caractère lipophile. Son accumulation dans le liquide céphalo-rachidien est d'environ 50 %. Il se métabolise par la

conjugaison avec l'acide glucuronique dans le foie. Environ 90 % de la dose sont excrétées dans les urines en 24 heures (Moffat *et al.*, 2011 ; Bambeke et Tulkens, 2008).

Malgré son large spectre d'action, l'usage clinique du chloramphénicol est aujourd'hui exceptionnel dans les pays industrialisés en raison de sa toxicité médullaire. Par contre, il est fréquemment utilisé dans les pays en développement, notamment pour le traitement des méningites bactériennes de par son faible coût et son efficacité. Il est aussi utilisé dans le traitement de la fièvre typhoïde non sensible à d'autres antibiotiques (Bambeke et Tulkens, 2008).

III.3.4. Tétracycline

La tétracycline se présente sous forme d'une poudre cristalline, jaune, très peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 % et dans le méthanol, assez soluble dans l'acétone. La tétracycline se dissout dans les solutions acides et alcalines diluées.



Tétracycline

Masse molaire : 444,4 gmol⁻¹

pKa : 3,3 ; 7,7 et 9,7

log P : 1,4

Son caractère lipophile permet, à la tétracycline une bonne absorption par voie orale. En outre, une balance hydrophile/hydrophobe adéquate lui permet de se distribuer dans les liquides et tissus de l'organisme et de pénétrer aisément dans les cellules où son accumulation est cependant modérée. Son élimination se fait principalement par voie rénale. La tétracycline est réservée au contrôle des infections à Chlamydia, Rickettsia, Mycoplasma, Brucella, les infections cutanées à Propionibacterium et Borrelia ou comme alternative aux infections à *Neisseria*, au traitement des pneumonies atypiques, de la syphilis et des amibiases (Bambeke et Tulkens, 2008).

DEUXIEME PARTIE :
DONNEES EXPERIMENTALES

II^{ème} PARTIE : DONNEES EXPERIMENTALES

Cette partie comprend deux chapitres : le premier reprend le cadre expérimental, le matériel et les méthodes utilisés et les protocoles expérimentaux ; le deuxième chapitre présente les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

CHAPITRE IV. CADRE EXPERIMENTAL, MATERIEL, METHODES ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

Ce chapitre décrit le cadre qui nous a servi à réaliser ce travail : le matériel qui a été utilisé, les méthodes qui ont été exploitées pour aboutir aux résultats ainsi que les protocoles expérimentaux.

IV.1. CADRE EXPERIMENTAL

Ce travail s'est réalisé dans six lieux différents. Il s'agit de la ville de Lubumbashi, site dans lesquels les échantillons ont été collectés, l'Hôpital Général Provincial de Référence Jason Sendwe, lieu dans lequel les échantillons collectés ont été conservés et les Laboratoires :

- de Chimie Analytique Pharmaceutique de l'Université de Liège (LCAP) ;
 - de Chimie Thérapeutique et de Pharmacognosie de l'Université de Mons (LCTP) ;
 - d'Analyse Pharmaceutique de l'Université de Mons (LAP) et ;
 - de Galénique et Analyse des Médicaments de l'Université de Lubumbashi (LGAM).
- Certaines activités ont été réalisées sur deux ou plusieurs sites

IV.1.1. Collecte des échantillons

Elle a été effectuée à Lubumbashi du 15 décembre 2017 au 15 février 2018. Les échantillons ont été acquis par achat, d'une part, dans le circuit formel de distribution de médicaments (CFDM), représentés par les établissements de vente en gros (EVG) aussi appelés dans cette étude "dépôts pharmaceutiques" ; et seulement huit pharmacies ouvertes au public (POP). Les EVG disposent d'une autorisation d'ouverture émanant de l'Autorité de Réglementation Pharmaceutique (ARP) du pays, qui est la Direction de la Pharmacie, Médicaments et Laboratoires du Ministère de la Santé Publique. En revanche, selon les informations qui nous ont été fournies, les huit pharmacies ouvertes au public ont entamé la procédure pour obtenir l'autorisation d'ouverture mais n'ont pas encore finalisé la démarche.

La liste complète de 24 EVG oeuvrant dans la ville a été obtenue auprès de l'Inspection Provinciale de la Santé du Haut-Katanga. Par conséquent, les échantillons ont été collectés dans

tous ces EVG. A Lubumbashi, les dépôts pharmaceutiques approvisionnent les autres points de vente de médicaments : les pharmacies ouvertes au public et les pharmacies hospitalières. Dans ce travail, la collecte des échantillons s'est donc focalisée sur les dépôts pharmaceutiques car des études antérieures ont montré que près de 80 % des médicaments circulant dans la ville sont fournis par ceux-ci (Kalonji, 2012 ; Mwamba *et al.*, 2015).

D'autre part, la collecte des échantillons a été orientée vers le circuit informel de distribution de médicaments (CIDM) représentés par les points de vente de médicaments non reconnues par les autorités sanitaires. La vente de médicaments dans ces circuits n'est donc pas reconnue par l'autorité compétente et la commercialisation des médicaments se fait sans une autorisation d'ouverture provenant de l'ARP. Dans cette étude, une attention particulière a été portée sur les marchés pharmaceutiques illicites (Kenya, Zambia, M'zee, Texaco, Katuba).

IV.1.2. Activités de laboratoire

Elles se sont déroulées dans les structures de recherche ou d'activités scientifiques citées dans ci-haut (voir point IV.1.)

Nous reprenons dans le tableau II les types d'activités réalisées dans chacune de ces structures.

Tableau II. Activités réalisées et structures d'accueil

Types d'activités	LAP	LCTP	LCAP	LGAM
Développement des méthodes HPLC			X	
Développement des méthodes spectro UV vis	X	x		
Validation des méthodes HPLC			X	
Validation des méthodes spectro UV vis	X	x		
Application des méthodes HPLC validées		x	X	
Application des méthodes spectro UV vis validées		x		x
Mesure d'uniformités de masse	X	x	X	x
Tests pharmacotechniques				x

Légende : LAP : Laboratoire d'analyse pharmaceutique ; LCTP : Laboratoire de chimie thérapeutique et pharmacognosie ; LCAP : Laboratoire de chimie analytique ; LGAM : Laboratoire de Galénique et d'Analyse des médicaments.

IV.2. MATERIEL

IV.2.1. Réactifs et solvants

Les réactifs et solvants ont été obtenus de fournisseurs agréés. Nous listons ci-dessous les réactifs et solvants utilisés ainsi que les fournisseurs auprès desquels ils ont été obtenus :

- Acétate d'ammonium (98%) p.a (Merck)
- Acide chlorhydrique 37 % (Merck) p.a
- Aérosil (TCI) sw
- Amidon (Merck)
- Carboxy méthylcellulose (TCI)
- Cellulose microcristalline (TCI)
- Crospoviton (TCI)
- Lactose monohydrate (Merck)
- Polyvinylpyrone (TCI)
- Stéarate de magnésium (VWR)
- Acétonitrile HPLC (Merck)
- Alcool isopropylique (Merck)
- Eau milli-Q (appareil millipore de type QPAK185)
- Ethanol HPLC (Merck)
- Hydroxyde de sodium (VWR)
- Hydroxyde de potassium (VWR)
- Méthanol HPLC (Merck)
- Phosphate de potassium monobasique (VWR)
- Phosphate de sodium monobasique (VWR)

IV.2.2. Standards

Les standards ont été commandés et obtenus de TCI (Belgique), de la Pharmacopée Européenne et de Sigma Aldrich (Belgique). Les bons de livraison de standards sont repris en annexe de ce travail.

Nous reprenons dans le tableau III les informations relatives aux standards utilisés.

Tableau III. Informations relatives aux standards utilisés

N°	Produits	N° de Lot	Fournisseur	Pureté (%)	Date d'expiration	Référence
1.	Azithromycine	AX4TF-KB	TCI (Belgique)	98,0	05/2023	A2076
2.	Céfadroxyl	209784	Sigma aldrich (Belgique)	97,5	08/2021	35061441
3.	Céfixime	2.0	Pharmacopée européenne	98,0	09/2021	A0325100
4.	Chloramphénicol	2Y2XD-BP	TCI (Belgique)	98,0	04/2022	C2255
5.	Erithromycine	JRD8F-AT	TCI (Belgique)	98,0	08/2023	E0751
6.	Tétracycline	KQ8AE-ET	TCI (Belgique)	98,0	11/2022	T2525

IV.2.3. Petit matériel et verrerie

La liste de la verrerie et de petit matériel utilisés dans ce travail est reprise ci-dessous :

- Ballons ballon ballons jaugés (5 mL, 10 mL, 20 mL, 25 mL, 30 mL, 50 mL et 100 mL)
- Bêchers (5 mL, 10 mL, 50 mL, 100 mL, et 250 mL et 1000 mL)
- Mortier et pilon en porcelaine
- Colonnes C18 : 100 mm x 4.6 mm ; 3.5 µm de marques (X-Bridge® et Kinetex®) fournit par VWR/Belgique
- Seringues 5cc
- Plaque à godet
- Cylindres gradués (10 mL, 100 mL et 1200 mL)
- Pipettes (0.5 mL, 1 mL, 1.5 mL, 2 mL, 2.5 mL, 3 mL, 5 mL)
- Pipettes pasteur en verre et poire
- Micropipettes 1-100 µL
- Tubes à essai en verre pyrex ou borosilicaté
- Tubes capillaires

Il convient de souligner que la verrerie fournie a été accompagnée d'un certificat d'assurance qualité. L'annexe VI (page xi) présente un exemple d'un certificat d'assurance qualité d'une verrerie utilisée dans le travail.

IV.2.4 Appareils

Les appareils suivants ont été exploités au cours de nos expérimentations.

- Appareil photo de marque *Canon PowerShot A2500*
- Bain à ultrason *Branson Ultrasonics corp*
- Balance analytique *Mettler-Toledo* modèle AE163
- Centrifugeuse *Beckman Coulter*
- Chaines HPLC *Waters Alliance 2695 et 2620* avec détecteur UV-DAD 2996
- Chaîne HPLC *Agilent Technologies 1260 Infinity II* avec détecteur UV-DAD
- Etuve de marque Memmert (PHYWE)
- pH mètre *Mettler-Toledo*
- Spectrophotomètre *UV Genesys 10S UV-VIS Spectrophotometer*
- Spectrophotomètre UV *Spectrophotometer UV- 16*
- Appareil de Friabilité *DISKER DF-2W FRIABILATOR*
- Appareil de dureté *DISTEK ETAB 300*
- Appareil de désagrégation *DISTEK SENSKIN 3200*

IV.3. METHODES

Dans ce point nous décrirons dans un premier temps les activités relatives à l'opération d'échantillonnage, les méthodes d'analyse de médicaments étudiées dans ce travail ensuite suivra le point qui traite l'application (utilisation en routine) des méthodes qui ont été mises au point dans ce travail.

IV.3.1. Echantillonnage

Nous traiterons dans ce point les différentes raisons ayant conduit au choix des antibiotiques, la stratégie utilisée pour collecter les échantillons et pour investiguer l'authenticité des échantillons collectés.

Avant d'aborder ces différents points, il convient de souligner que la taille de notre échantillon a été estimée (N) en utilisant l'équation ci-après (Benner, 1999 ; Tshilombo *et al.*, 2018) :

$$N = p(1-p) z^2 / E^2$$

Avec p : la prévalence des médicaments de qualité inférieure

z: l'intervalle de confiance

E : la marge d'erreur

Les données précises relatives à la prévalence des antibiotiques FQI en RD Congo ne sont pas disponibles. Néanmoins, il est rapporté que dans les régions de l'Afrique subsaharienne une prévalence d'antibiotiques de qualité inférieure est d'environ 30 % (Delepierre *et al.*, 2012 ; OMS, 2017a ; Mwamba *et al.*, 2015). Nous avons donc pris en compte cette prévalence (p=0.3) avec la marge d'erreur E de 10 % et un intervalle de confiance de 95 % (z = 1.96) ; la taille de l'échantillon a été ainsi estimée à 81 échantillons. Ceci a permis de nous indiquer que dans le cadre de ce travail, la taille de notre échantillon devrait être d'au moins 81 échantillons pour qu'elle soit représentative.

IV.3.1.1. Sites de collecte

Comme mentionné dans le point IV.1.1, le site de collecte a été scindé en deux grandes composantes : circuits de distribution formel et informel de médicaments. Sur ce, il convient de souligner que le paysage pharmaceutique de la ville de Lubumbashi présente une répartition déséquilibrée de points de vente de médicaments. En effet, tous les grossistes répartiteurs (dépôts pharmaceutiques) sont situés dans le centre-ville et la ville compte 24 établissements de vente en gros de produits pharmaceutiques selon les informations obtenues des autorités sanitaires locales. Aux 24 EVG considérés dans cette étude comme circuit formel, s'ajoutent aussi huit pharmacies ouvertes au public qui sont enregistrées auprès de l'ARP locale. Par conséquent, les points de vente de médicaments inclus dans le circuit formel sont agréés et

réglémentés par l'ARP et son personnel se compose de Pharmacien et le professionnel de santé qualifié. Dans le cadre de ce travail, les échantillons ont été collectés dans tous les points de ventes reconnus par l'ARP.

Par ailleurs, en ce qui concerne le circuit informel, les points de vente ne disposent pas d'une autorisation d'ouverture de l'établissement pharmaceutique et ne sont donc pas reconnues par l'ARP. A cet effet, leur nombre exact n'est pas maîtrisé par les autorités sanitaires. Toutefois, une enquête menée en 2017 sur les pharmacies informelles oeuvrant à Lubumbashi dans la province du Haut-Katanga a permis d'identifier 333 points de vente (ACTWATCH, 2017). Pour ce qui est de ce travail, une attention particulière a été orientée vers les marchés illicites de vente de médicaments car (i) les études antérieures ont montré que plusieurs lots de médicaments falsifiés arrivent dans ces types de marchés et la probabilité d'y trouver les médicaments n'ayant pas d'autorisation de mise sur le marché est élevée (Legris, 2005 ; Mwamba *et al*, 2015) et (ii) dans le cadre de la surveillance de la qualité de médicaments dans une contrée donnée, l'OMS recommande de se focaliser particulièrement sur les lieux de collecte susceptibles de commercialiser les médicaments de qualité douteuse (OMS, 2015). Ceci nous a permis de collecter les échantillons dans 47 points de vente informels situés dans quatre communes de la ville de Lubumbashi.

Les approches d'échantillonnage dans les sites de collecte ont été différentes. En effet, nous avons utilisé l'approche d'échantillonnage manifeste lors de la collecte des échantillons dans les circuits formels de distribution, c'est-à-dire, en tant qu'enquêteur, nous nous sommes identifié et avons expliqué au Pharmacien de l'EVG l'objet de l'étude. En revanche, nous avons utilisé l'approche du client anonyme dans les circuits informels de distribution où nous nous présentions en tant que client désirant acheter les médicaments pour des raisons différentes telles que détaillées dans les lignes ci-dessous.

De manière détaillée, la stratégie de collecte a été effectuée en se conformant d'une part, aux lignes directives de l'OMS relatives aux enquêtes de contrôle qualité des médicaments (OMS, 2015) et d'autre part, à celle suggérée par Newton *et al* (2009).

A cet effet, nous avons tenu compte :

- de la localisation géographique de point de vente (lieu à partir duquel les médicaments sont vendus) agréés et non agréés par les Autorités de Régulation Pharmaceutique (ARP) ; dans certains cas, il est difficile d'obtenir des informations sûres, spécialement pour les points de vente non agréés par l'ARP, car ces derniers

- peuvent être mobiles de sorte qu'il ne soit pas possible de cartographier avec exactitude le territoire des vendeurs de médicaments itinérants ; et
- du niveau de la chaîne d'approvisionnement auquel les médicaments de qualité inférieure arrivent sur le marché. La prise en compte de ces deux paramètres permet de fournir une estimation de la proportion de points de vente qui vendent les médicaments de mauvaise qualité et la proportion de médicaments de mauvaise qualité dans les points de vente.

Avant l'opération de collecte des échantillons, des indications claires relatives aux comportements à adopter lors de l'achat des échantillons de médicaments ont été définies ; par exemple dans les points de vente informels, nous devons indiquer que nous souhaitons obtenir un médicament contre les infections pour un patient x ; nous ne devons pas révéler aux vendeurs les raisons pour lesquelles les médicaments sont achetés ; nous devons nous habiller et nous comporter convenablement, sans signes ni discours pouvant indiquer que nous sommes issus d'un milieu scientifique et que les médicaments achetés feront l'objet d'analyses.

IV.3.1.2. Choix de molécules médicamenteuses

Les principes actifs ont été choisis sur base de leur utilisation en milieux hospitaliers. C'est dans ce contexte que nous avons réalisé une étude intitulée «Profil de l'utilisation des antibiotiques et des pathologies infectieuses à Lubumbashi, République Démocratique du Congo : Etude descriptive portant sur 2014-2015» (Mwamba *et al.*, 2018).

Cette étude a été réalisée dans huit hôpitaux publics de la ville de Lubumbashi : Hôpital Général de Référence (HGR) Jason Sendwe, Cliniques Universitaires, Hôpital SNCC (Société Nationale de Chemin de fer au Congo), HGR Kenya, HGR Katuba, HGR Kamalondo, HGR Kampemba, et Hakika. Ces hôpitaux ont respectivement une capacité d'environ 320, 270, 220, 80, 42, 70, 40 et 35 lits. Il s'agissait d'une étude descriptive transversale avec récolte rétrospective des données durant la période janvier 2014 à décembre 2015.

L'étude a porté sur 1164 dossiers de patients chez qui au moins un antibiotique a été prescrit suite à un diagnostic de maladies infectieuses (infections communautaires) positif, dans les services de médecine interne et de pédiatrie. Les antituberculeux, les antiparasitaires, les antiviraux et les antirétroviraux n'ont pas été pris en compte dans l'étude.

La classification des antibiotiques a été réalisée suivant la liste nationale des médicaments essentiels en RD Congo (Ministère de Santé, 2016). Par ailleurs, la classification des pathologies infectieuses a été faite selon la classification statistique internationale des maladies et des problèmes de santé connexes (CIM-10, 2017).

Tout patient a été exclu lorsqu'aucun antibiotique n'a été préconisé et lorsqu'une autre pathologie a été diagnostiquée en dehors des pathologies infectieuses. Les données des malades ont été recueillies entre le mois d'avril et juillet 2017 et anonymisées.

L'exploitation des dossiers a permis de recueillir les données ci-après : âge du patient, sexe, diagnostic, traitement instauré, antibiotique(s) prescrit(s) ainsi que leurs formes galéniques.

Les fréquences ont été calculées à l'aide de logiciel Epi-info (version 7.0). Le seuil de signification de résultats a été fixé à $p \leq 0.05$ et la force de l'association a été évaluée en utilisant OR calculé sur StatCalc.

L'issue de cette étude a permis de sélectionner six antibiotiques qui sont étudiés dans ce travail : céfadroxil, céfixime, chloramphénicol, tétracycline, azithromycine et érythromycine (voir chapitre V). Il convient de noter que tous les antibiotiques sélectionnés sont repris sur la liste nationale de médicaments essentiels en République Démocratique du Congo.

IV.3.1.3. Traitement et investigation de l'authenticité des échantillons collectés

Pour distinguer les échantillons collectés, nous avons pris en compte le principe actif, sa forme galénique et son numéro de lot (tel que fourni par le fabricant). Par conséquent, deux échantillons ont été considérés différents lorsque ces trois éléments n'étaient pas identiques.

En revanche, au cas où deux échantillons présentaient un même numéro de lot, une même forme galénique et un même principe actif une vérification minutieuse a été effectuée pour s'assurer que d'autres éléments étaient aussi identiques notamment : l'emplacement de mentions sur l'emballage, la couleur de l'emballage et de la forme pharmaceutique, le logo du fabricant, l'adresse du fabricant, le code barre, l'hologramme, la notice etc. A cet effet, une fiche d'inspection visuelle (annexe III page iii) a été établie et elle reprenait des informations notamment sur : les emballages primaires et secondaires, la notice, l'apparence physique de comprimé, capsule, solution et poudre pour suspension, la granulométrie des poudres pour suspensions buvables, ...

En cas de doutes, le fabricant a été contacté, soit par e-mail, soit à partir de son site internet afin qu'il atteste de la véracité des informations reprises sur son emballage ; nous leur joignons une photo haute résolution de l'échantillon ou, le cas échéant, l'échantillon lui-même. L'annexe IV (page v) reprend le modèle de la lettre envoyée aux fabricants. Nous avons également vérifié si les échantillons collectés sont enregistrés et autorisés à être commercialisés en RD Congo en consultant, auprès de l'Autorité de Réglementation Pharmaceutique locale, la liste officielle des médicaments enregistrés.

Les échantillons collectés ont été directement acheminés dans une échantillothèque à la Pharmacie de l'Hôpital Général Provincial de Référence Jason Sendwe. A l'arrivée des échantillons la procédure ci-après a été suivie :

- Vérification de l'échantillon : apparence, intégrité ; prise de photos à l'aide d'un appareil photographique de marque Canon Power Shot A2500 ;
- Attribution d'un code ;
- Stockage des échantillons en suivant les spécifications du fabricant (dans ce cas-ci c'est à la température ambiante : 15°C-25°C). De ce fait, une fiche de suivi de température (annexe II page ii) a servi à contrôler la température à laquelle les échantillons ont été conservés.

Les formes galéniques concernées ont été de formes destinées à administration orale : comprimés, gélules et poudres pour suspensions buvables.

Les critères d'inclusion suivants ont été considérés :

- Tout médicament dont la composition (en monothérapie) était à base d'azithromycine, de céfadroxil, de céfixime, de chloramphénicol, d'érythromycine ou de tétracycline ;
- Une durée de validité d'utilisation d'au moins un an ;
- Pour les comprimés ou gélules : la disponibilité d'au moins 20 unités de prise
- Pour les suspensions buvables, au moins deux flacons

Les critères de sélection ont éliminé :

- Tout médicament qui ne contient pas les principes actifs concernés dans l'étude ;
- Tout médicament contenant les principes actifs concernés mais périmé, corrompu, altéré ou détérioré avant les opérations d'analyse
- Tout médicament en monothérapie contenant la molécule concernée par l'étude mais destinée à une administration parentérale, cutanée, oculaire etc.

IV.3.2. Méthodes analytiques

Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur deux méthodes analytiques : la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la spectrophotométrie UV-visible. En effet, la HPLC est la méthode analytique la plus appropriée et plus utilisée dans les analyses de médicaments, elle est aussi la plus recommandée dans les monographies officielles (Martino *et al*, 2010 ; Koczwara et Dressman, 2017 ; USP, 2018 ; Pharmacopée Européenne, 2016).

Par ailleurs, la spectrophotométrie UV-Vis occupe une place importante dans les laboratoires qui contrôlent la qualité de médicaments qui circulent dans plusieurs pays en développement comme la RD Congo. En outre, le Laboratoire de Galénique et Analyse de Médicaments de l'Université de Lubumbashi dispose d'un spectrophotomètre UV-Vis qui est très utilisé dans des analyses de médicaments.

C'est dans ce contexte que nous avons réalisé une revue systématique de méthodes chromatographiques liquides et spectrophotométriques UV-vis dans l'objectif d'évaluer l'impact de ces méthodes dans la lutte contre la falsification des antibiotiques (Mwamba *et al.*, 2019). La méthodologie qui a été suivie pour mener cette étude est décrite ci-après :

Revue systématique des méthodes de CLHP et de spectrophotométrie UV-VIS

Le choix de la littérature a été opéré à l'aide des bases de données en ligne : PUBMED et Google Scholar. La combinaison des termes tels que : « substandard/falsified/counterfeit medicines/drugs » et « method detection substandard/ falsified/counterfeit medicines/drugs » a été réalisée. Dans le souci d'être plus spécifique, la combinaison des mots ci-après a été également exécutée : « spectrophotometric/LC/HPLC/ development/validation drugs » et « detection/determination antibiotic substandard/counterfeit ». Les articles concernés sont ceux publiés entre 2000 et Juillet 2017. Cette revue systématique a été réalisée conformément aux lignes directrices de PRISMA (Moher *et al.*, 2009 ; Almuzaini *et al.*, 2013).

L'étude n'a considéré que des articles publiés en anglais et en français et portant sur le développement et la validation de méthodes de spectrophotométrie UV-visible et de chromatographie liquide à haute performance pour la détermination de teneurs en principe actif dans des formulations pharmaceutiques. Les médicaments concernés dans l'étude étaient ceux faisant l'objet de ce travail.

Les articles scientifiques sur (i) le contrôle qualité des médicaments ; (ii) le développement et la validation de méthodes analytiques pour des médicaments qui ne possèdent pas l'effet antibactérien ; (iii) les méthodes développées et validées et dont la détermination de la teneur en principe actif a été effectuée dans les liquides biologiques (sérum, plasma, urine, sang, sécrétions bronchiques) n'ont pas été pris en compte.

Dans un premier temps, l'examen du titre de l'étude a été réalisé afin de juger de sa conformité par rapport aux critères de sélection. Pour les articles dont le titre suscitait des doutes, nous passons à l'analyse des abstracts.

Les articles présélectionnés ont été évalués par rapport aux 14 paramètres ayant été établis dans l'étude : le principe actif concerné, le type de méthode, l'appareil(s) utilisé(s), la phase mobile

utilisée, le(s) diluant(s) utilisé(s), la longueur d'onde, la démonstration de la linéarité, spécificité, justesse, fidélité, exactitude, robustesse, limite de détection et de quantification de la méthode. Pour être retenu, chaque article devait réunir ces paramètres indiqués. L'analyse de ces données a été réalisée sur Epi-info version 7.0.

IV.3.2.1. Méthodes séparatives : Chromatographie liquide à haute performance

La HPLC a été utilisée dans ce travail au cours de la phase de développement et de validation. Nous avons l'avons ensuite appliqué aux échantillons en vue d'en confirmer et d'en consolider l'utilisation en routine.

Nous donnons dans les points ci-dessous les expérimentations effectuées au cours de la phase de développement, de la phase de validation ainsi que les conditions chromatographiques finales qui ont été retenues.

IV.3.2.1.1. Phase de développement

Nous avons développé deux méthodes, une concernant l'azithromycine et l'érythromycine, et l'autre pour le céfadroxil et le chloramphénicol.

S'agissant de la méthode d'analyse HPLC de l'azithromycine et de l'érythromycine, les expérimentations ont été effectuées en prenant en compte deux facteurs sur lesquels les modifications ont été opérées : le pH de la phase aqueuse et la température du four de la colonne. Le pH de la phase aqueuse a été ajusté par du tampon acétate d'ammonium et trois niveaux ont été considérés (pH 3, 6 et 10).

La température du four de la colonne avait également trois niveaux 25, 30 et 35°C. Le temps de gradient a été fixé à 18 minutes.

Concernant le céfadroxyl et le chloramphénicol, nous avons appliqué la méthode générique d'analyse de 19 antibiotiques (amoxicilline, ampicilline, céfadroxyl, céfotaxime, ceftriaxone, chloramphénicol, ciprofloxacine, clindamycine, doxycycline, levofloxacine, métronidazole, norfloxacine, phénoxyméthylpenicilline, sulfaméthoxazole, tétracycline, triméthoprime, acide clavulanique, sulbactam et tazobactam) développée par Mbinze *et al* (2013). Il convient de souligner qu'après la phase de développement de cette méthode d'analyse de ces 19 antibiotiques, ces auteurs avaient seulement validé la méthode d'analyse de la ceftriaxone et le sulbactam (Mbinze *et al*, 2013). Dans le cadre de notre travail, nous avons adapté cette méthode générique en fonction du type de colonne dont nous disposions et nous l'avons validé par la suite.

Nous avons préparé deux solutions au cours de la phase de développement de la manière suivante :

- Dans deux ballons jaugés tarés de 10 mL, dissoudre 50 mg d'azithromycine et d'érythromycine dans du méthanol puis porter au volume avec le même solvant. Diluer ces solutions cinq fois avec un mélange de méthanol : eau (98 % :2 % v/v) pour atteindre une concentration finale de 1000 µg/mL.
- Dans un ballon jaugé taré de 20 mL, dissoudre 20 mg et 80 mg de céfadroxil et de chloramphénicol dans du méthanol puis porter au volume avec le même solvant. Diluer cette solution 20 fois avec un mélange de méthanol : eau (98 % :2 % v/v) pour atteindre respectivement une concentration finale de 50 µg/mL et 200 µg/mL de céfadroxil et de chloramphénicol.

Les concentrations finales de l'azithromycine et de l'érythromycine étaient largement supérieures à celle des autres molécules à cause de leur faible coefficient d'extinction molaire.

IV.3.2.2.2. Phase de la validation

La validation a été effectuée conformément aux directives de l'ICH Q2 (R1) (ICH, 2008). La stratégie de l'erreur totale représentée par le profil d'exactitude a été utilisée comme outil décisionnel pour valider les méthodes (Hubert *et al.*, 2007a ; Hubert *et al.*, 2008). Les critères de validation suivants ont été pris en compte : sélectivité, justesse, fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire), exactitude, linéarité, limite de détection et de quantification et intervalle de dosage.

Concrètement, la phase de validation a été effectuée en réalisant deux types de préparation :

- standard de calibration (SC) et ;
- standard de validation (SV).

a) Préparation des solutions de standard de calibration

Dans un ballon jaugé taré de 20 mL, peser exactement 20 mg de céfadroxil, le dissoudre dans le méthanol, puis porter au volume en utilisant le même solvant. Concernant l'azithromycine, peser exactement 50 mg dans un ballon jaugé taré de 10 mL, le dissoudre dans le méthanol puis porter au volume avec le même solvant. Ces solutions stock ont permis par la suite d'obtenir des solutions filles ayant trois niveaux différents de concentrations en utilisant comme diluant le mélange méthanol : eau (98% :2% v/v).

- Niveau 1 (50%) : 25 µg/mL (céfadroxil), 500 µg/mL (azithromycine)
- Niveau 2 (100%) : 50 µg/mL (céfadroxil), 1000 µg/mL (azithromycine)
- Niveau 3 (150%) : 75 µg/mL (céfadroxil), 1500 µg/mL (azithromycine)

Ces solutions de calibration ont servi à évaluer notamment la linéarité de la méthode à partir de la concentration introduite (standard de calibration) et la concentration calculée (standard de validation).

Il importe de souligner que l'ICHQ₂R₁ propose un intervalle de dosage de 80 à 120 % et le guide de Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) propose un intervalle de 60 à 140 %. Dans notre étude, nous avons utilisé un intervalle de 50 à 150 % car il englobe les deux référentiels (ICH et SFSTP) mais aussi dans le contexte de la falsification de médicaments, il est possible de trouver de pourcentage inférieur à 60 %.

b) Préparation des solutions de standard de validation

Cette solution a été préparée en incorporant la matrice dans les standards pour simuler le plus possible un médicament réel. Ceci a permis d'évaluer l'effet matrice sur les analytes ainsi que la sélectivité de la méthode. Cette matrice a été constituée avec des excipients communément utilisés dans la formulation des médicaments qui circulent en RD Congo. Nous avons calculé la moyenne des poids des comprimés d'azithromycine et des gélules de céfadroxil de nos échantillons pour estimer la proportion entre la substance active et la matrice dans la formulation pharmaceutique.

Concernant l'azithromycine, la proportion de principe actif était de 58,5 % et 41,5 % (n=50 ; écart type 0,07) pour la matrice alors que pour céfadroxil la proportion était de 90,3 % pour le principe actif et 9,7 % (n=50 ; écart type 0,08) pour la matrice.

De manière détaillée, la solution stock de standard de validation de l'azithromycine a été obtenue comme suit :

- Dans un ballon jaugé taré de 25 mL, peser respectivement amidon (0,0266 g), stéarate de magnésium (0,0107 g), crospoviton (0,0124 g), lactose monohydrate (0,0153 g) et cellule microcristalline (0,0153) ;
- Ajouter le méthanol puis porter au volume en utilisant le même solvant ;
- Transférer 1 mL de cette solution dans un ballon jaugé de 10 mL contenant 50 mg du standard d'azithromycine. Puis porter au volume en utilisant le méthanol comme diluant.

Quant au céfadroxil, nous avons procédé de la manière suivante :

- Dans un ballon jaugé taré de 100 mL, peser respectivement amidon (0,0139 g), stéarate de magnésium (0,0643 g) et lactose monohydrate (0,1943 g)
- Ajouter le méthanol puis porter au volume en utilisant le même solvant

- Transférer 1 mL de cette solution dans un ballon jaugé de 20 mL contenant 20 mg du standard de céfadroxil. Puis porter au volume en utilisant le méthanol comme diluant

Il convient de signaler que les solutions contenant la matrice ont été filtrées sur des disques de filtration en seringue de PTFE de 0,45 µm avant de diluer les aliquotes pour les expériences.

Les solutions stock de standards de validation de l'azithromycine et du céfadroxil obtenues ont ensuite permis d'obtenir cinq solutions filles à différents niveaux de concentration :

- Niveau 1 (50%) : 25 µg/mL (céfadroxil), 500 µg/mL (azithromycine)
- Niveau 2 (75%) : 37,5 µg/mL (céfadroxil), 750 µg/mL (azithromycine)
- Niveau 3 (100%) : 50 µg/mL (céfadroxil), 1000 µg/mL (azithromycine)
- Niveau 4 (125%) : 62,5 µg/mL (céfadroxil), 1250 µg/mL (azithromycine)
- Niveau 5 (150%) : 75 µg/mL (céfadroxil), 1500 µg/mL (azithromycine)

Nous avons indépendamment préparé trois solutions pour chaque niveau de concentration. La préparation de ces solutions a été répétée pendant trois jours correspondant à trois différentes séries ; en d'autres termes, nous avons au total effectué pour chaque analyte 27 essais pour le standard de calibration et 45 pour le standard de validation.

Les solutions ont été préparées à l'abri de la lumière et le bain à ultrason a été utilisé pour assurer le plus possible une dissolution complète.

IV.3.2.2.3. Conditions chromatographiques

Le développement et la validation des méthodes ont été réalisés sur deux chaînes HPLC de marque *Water* 2695 et 2620 couplées à un détecteur UV-DAD 2996. La colonne était de marque *Xbridge* C18 (100 mmx4,6 mm diamètre, dimension des particules 3,5 µm).

L'application de ces méthodes a été effectuée sur deux chaînes HPLC de marque *Agilent Technologies* 1260 *Infinity II* et *Waters* 2695. Les colonnes étaient de marque *Kinetex* (100 mm x 4,6 mm diamètre, dimension des particules 3,5 µm) et *Xbridge* C18 (100 mm x 4,6 mm diamètre, dimension des particules 3,5 µm). La longueur d'onde a été fixée à 220 nm pour toutes les molécules. Le débit était de 1 mL/min.

Les données chromatographiques collectées étaient essentiellement :

- les spectres UV des analytes, les temps de rétention,
- les aires des pics et les hauteurs des pics. La solution tampon de la phase mobile était constituée de 10 mM d'acétate d'ammonium pH 6 (pour le céfadroxil et le chloramphénicol) et 10 (pour l'azithromycine et l'érythromycine). Cette solution a été ajustée soit avec de l'HCl 1M ou du NaOH 1M selon la valeur du pH cible.

IV.3.2.2.4. Traitement des données

Les logiciels *Empower 2.0* (waters, corporation, MA, Etats unis) et *Open LAB CDS (Chem Station Edition)* de Windows a permis de contrôler les systèmes HPLC, d'enregistrer le signal du détecteur et d'interpréter les chromatogrammes générés. Le logiciel *E-noval® V3.0* (Arlenda, Belgique) a permis le traitement des données de validation.

IV.3.2.2. Méthodes non séparatives : la Spectrophotométrie UV-VIS

La spectrophotométrie est une technique qui repose sur la proportionnalité entre la concentration en molécules absorbantes d'une solution et son absorbance selon la loi de Beer-Lambert. Les solutions d'une concentration connue sont préparées dans le milieu approprié pour l'établissement de la courbe d'étalonnage. L'absorbance est mesurée à la longueur d'onde λ spécifique contre une solution blanc qui est souvent constitué des éléments de la matrice. L'échantillon est également mis en solution après une pesée précise, choisie pour obtenir une concentration théorique comprise dans la courbe d'étalonnage et son absorbance est mesurée. Ainsi, nous avons utilisé la spectrophotométrie UV au cours des phases de développement et de validation. Cette méthode a également permis d'analyser les échantillons de céfixime, chloramphénicol, érythromycine et tétracycline.

IV.3.2.2.1. Phase de développement

Cette phase a concerné : le céfixime, l'érythromycine et la tétracycline. Pour le développement des méthodes spectrophotométriques UV visible, des expérimentations ont été effectuées dans le but de retenir la concentration cible à laquelle la méthode devrait être exécutée, le milieu dans lequel la préparation devrait être réalisée et la longueur d'onde pour le dosage des analytes étudiés.

Par ailleurs, il sied de souligner que le chloramphénicol n'a pas été concerné par la phase de développement et de validation. Nous avons appliqué la méthode décrite dans la Pharmacopée Britannique pour analyser ces échantillons.

Dans les lignes ci-après, nous indiquons des expérimentations qui ont été effectuées pour préparer des solutions lors de la phase du développement.

Trois solutions stocks ont été préparées pour chaque molécule

Le céfixime

- Dans trois différents ballons jaugés tarés de 20 mL, peser séparément 20 mg de céfixime
- Dissoudre le contenu du premier ballon jaugé dans l'eau, celui du deuxième dans l'acide chlorhydrique 0,1N et celui du troisième dans l'hydroxyde de sodium 0.1N
- Porter au volume les trois ballons jaugés en utilisant à chaque fois le diluant initial

- Diluer 50, 33,3 et 25 fois ces trois solutions afin d'obtenir respectivement des solutions filles à 20, 30 et 40 $\mu\text{g/mL}$. Mesurer l'absorbance à l'aide du spectrophotomètre UV à longueur d'onde différentes : 220, 254 et 257 nm.

L'érythromycine

- Dans trois différents ballons jaugés de 10 mL, peser individuellement 20 mg d'érythromycine
- Dissoudre le contenu du premier ballon jaugé dans du méthanol, celui du deuxième dans l'acide chlorhydrique 0,1N et celui du troisième dans l'hydroxyde de sodium 0,1N.
- Diluer ces solutions deux et quatre fois pour obtenir respectivement des solutions filles à 1000 et 500 $\mu\text{g/mL}$. Mesurer l'absorbance à l'aide du spectrophotomètre UV à longueur d'onde différentes : 215 et 305 nm.

La tétracycline

- Dans trois différents ballons jaugés de 20 mL, peser séparément 20 mg de tétracycline
- Dissoudre le contenu du premier ballon jaugé dans l'eau, celui du deuxième dans l'acide chlorhydrique 0,1 N et celui du troisième dans l'hydroxyde de sodium 0,1N puis porter au volume en utilisant le solvant initial
- Diluer 100, 66 et 50 fois ces solutions afin d'obtenir des solutions filles à 10, 15 et 20 $\mu\text{g/mL}$. Mesurer l'absorbance à l'aide du spectrophotomètre UV à longueur d'onde différentes : 270, 276 et 357 nm.

IV.3.2.2.2. Phase de validation

La procédure de validation appliquée en HPLC a été la même que celle utilisée en spectrophotométrie UV-Vis. Les méthodes spectrophotométriques développées pour le céfixime, l'érythromycine et la tétracycline ont été validées.

Deux types de préparation ont été réalisés :

a) Préparation des solutions de standard de calibration

Les solutions stock distinctes de céfixime (1000 $\mu\text{g/mL}$) et tétracycline (1000 $\mu\text{g/mL}$) ont été préparées dans un ballon jaugé de 20 mL, le diluant utilisé était l'eau alors que la solution stock d'érythromycine (2000 $\mu\text{g/mL}$) a été préparée en utilisant le méthanol comme diluant. Ces solutions stock ont permis d'obtenir trois solutions filles à différents niveaux de concentration :

- Niveau 1 (50 %) : 5 $\mu\text{g/mL}$ (tétracycline), 20 $\mu\text{g/mL}$ (céfixime), 250 $\mu\text{g/mL}$ (érythromycine)

- Niveau 2 (100 %) : 10 µg/mL (tétracycline), 40 µg/mL (céfixime), 500 µg/mL (érythromycine)
- Niveau 3 (150 %) : 15 µg/mL (tétracycline), 60 µg/mL (céfixime), 750 µg/mL (érythromycine).

b) Préparation des solutions de standard de validation

Nous avons appliqué la même procédure de préparation que pour les méthodes HPLC. Cependant, pour le céfixime, la proportion de principe actif était de 59 % et 41 % pour la matrice, pour la tétracycline 76 % (principe actif) et 24 % (matrice) pour érythromycine 80 % (principe actif) et 20 % (matrice).

De manière détaillée, l'obtention des solutions stocks pour la préparation de standard de validation ont été obtenues en suivant la procédure ci-après :

Céfixime,

- Dans un ballon jaugé de 25 mL, peser respectivement amidon (0,0256 g), stéarate de magnésium (0,0102 g), polyvinylpyrrolidone (0,0119 g), lactose monohydrate (0,0119 g) et cellulose microcristalline (0,1467 g) ;
- Ajouter l'eau, agiter au bain à ultrason et au Vortex pendant 5 minutes, puis porter au volume avec le même solvant ;
- Transférer 1 mL de cette solution dans un ballon jaugé de 20 mL contenant 20 mg du standard de céfixime
- Ajouter ce mélange dans l'eau, puis porter au volume en utilisant le même solvant

Erythromycine,

- Dans un ballon jaugé de 50 mL, peser respectivement de l'amidon (0,0189 g), le stéarate de magnésium (0,0750 g), le lactose monohydrate (0,1119 g) et la cellulose microcristalline (0,1119 g);
- Ajouter du méthanol, agiter au bain à ultrason et au Vortex pendant 5 minutes, puis porter au volume avec le même solvant ;
- Transférer 1 mL de cette solution dans un ballon jaugé de 10 mL contenant 20 mg du standard d'érythromycine
- Ajouter ce mélange dans le méthanol puis porter au volume avec le même solvant

Tétracycline,

- Dans un ballon jaugé de 50 mL, peser respectivement de l'amidon (0,0210 g), le stéarate de magnésium (0,0968 g) et le lactose monohydrate (0,2921 g) ;
- Ajouter l'eau, agiter au bain à ultrason et au vortex pendant 5 minutes, puis porter au volume avec le même solvant ;
- Transférer 1 mL de cette solution dans un ballon jaugé de 20 mL contenant 20 mg du standard de tétracycline
- Ajouter ce mélange dans l'eau puis porter au volume avec le même solvant

La dissolution au bain à ultrason (5 minutes) et l'agitation au vortex (5 minutes) étaient nécessaires pour obtenir le plus possible la dissolution de la poudre.

Ces solutions stocks ont ensuite permis d'obtenir cinq solutions filles ayant les niveaux suivants de concentration :

- Niveau 1 (50 %) : 5 µg/mL (tétracycline), 20 µg/mL (céfixime), 250 µg/mL (érythromycine) ;
- Niveau 2 (75 %) : 7,5 µg/mL (tétracycline), 30 µg/mL (céfixime), 375 µg/mL (érythromycine) ;
- Niveau 3 (100 %) : 10 µg/mL (tétracycline), 40 µg/mL (céfixime), 500 µg/mL (érythromycine) ;
- Niveau 4 (125 %) : 12,5 µg/mL (tétracycline), 50 µg/mL (céfixime), 62,5 µg/mL (érythromycine) ;
- Niveau 5 (150 %) : 15 µg/mL (tétracycline), 60 µg/mL (céfixime), 750 µg/mL (érythromycine)

Il importe de noter que, concernant la méthode de dosage de céfixime, nous avons noté pendant la phase de validation un important effet de matrice. Cette situation a amené à recourir à la « méthode des ajouts-dosés », qui est une méthode quantitative, la plus souvent utilisée lorsque l'échantillon comporte des éléments qui donnent lieu à des effets matrices, où les composants supplémentaires peuvent réduire ou augmenter le signal d'absorbance de l'échantillon étudié, ce qui se traduit par des erreurs significatives dans les résultats d'analyse.

Le mode opératoire de la méthode des ajouts dosés appliqué dans ce travail, est repris dans le point qui décrit les protocoles expérimentaux.

IV.3.3. Application de méthodes analytiques validées (utilisation en routine)

Les méthodes d'analyse validées pour l'azithromycine, le céfadroxil, le céfixime, l'érythromycine et la tétracycline ont été appliquées aux échantillons prélevés localement en vue d'assurer l'utilisation en routine des procédures. S'agissant du chloramphénicol, comme évoqué ci-haut, la méthode spectrophotométrique UV-visible décrite dans la pharmacopée a été exploitée.

Les échantillons ont subi le même traitement que la substance de référence (standard). Ils ont été préparés dans les mêmes conditions que le standard, à une concentration correspondant au troisième niveau du standard de validation (100 %) : 50 µg/mL pour le céfadroxil, 1000 µg/mL pour l'azithromycine : 10 µg/mL pour la tétracycline, 40 µg/mL pour le céfixime et 500 µg/mL pour l'érythromycine. Une agitation au vortex (5 min) et une sonication au bain à ultrason (5 minutes) ont été nécessaires pour obtenir le plus possible la dissolution des poudres. Dans des cas échéants, une centrifugation (5 min : 2500 tours par minute) a été réalisée. Le chloramphénicol a été préparé à une concentration de 20 µg/mL. Le mode opératoire détaillé de la préparation des échantillons est donné dans le point **IV.4.**

Par ailleurs, il convient de souligner que la matrice qui a été utilisée dans cette étude a ciblé les formes gélules et comprimés. Nous avons utilisé les méthodes HPLC décrites dans la Pharmacopée Américaine pour analyser les échantillons d'antibiotiques présentés en Suspension buvable. Toutefois, les résultats de dosage obtenu ont été comparés avec ceux fournis par les méthodes mises au point dans ce travail afin de voir s'il existe une relation linéaire entre les deux méthodes. Ce lien a été évalué en déterminant le coefficient de détermination R^2 qui devrait être proche de un.

Le mode opératoire suivi pour les méthodes HPLC appliquées aux suspensions buvables est présenté dans le point qui traite les protocoles expérimentaux.

Spécifications

Les spécifications qui ont été prises en compte sont celles de la pharmacopée américaine

- 90,0 % - 110,0 % pour azithromycine (comprimés et gélules) et céfixime (comprimés) ;
- 90,0 % - 120,0 % pour, céfadroxil (gélules et Suspensions), céfixime (Suspensions), chloramphénicol (gélules) et érythromycine (comprimés et Suspensions) ;
- 90,0 % – 125,0 % pour tétracycline.

Pour les échantillons qui étaient hors spécifications, une deuxième analyse a été effectuée par un autre analyste pour tirer une conclusion finale.

IV.4. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

Nous abordons dans ce point les différents modes opératoires appliqués sur les échantillons ayant permis d'obtenir les résultats qui sont présentés dans ce travail. Les points suivants seront successivement traités : tests physiques et pharmacotechniques, examens organoleptiques, identification de substances actives et dosages de principes actifs.

IV.4.1. Tests physiques

IV.4.1.1. Examens organoleptiques

Ces examens sont réalisés à l'aide d'une inspection visuelle attentive du produit et de son emballage. Nous avons ressorti des informations sur l'échantillon prélevé en rapport avec la Dénomination Commune Internationale (DCI), et le nom de marque, le nom du fabricant ainsi que son adresse, la forme galénique de l'échantillon, le pays de provenance, la date de fabrication et de péremption, la vérification de l'état du comprimé ou de la gélule (si une boîte est endommagée, ouvrir et s'assurer que les comprimés et/ou gélules sont intacts et que le blister est intact), vérification de la véracité du code barre présent sur l'emballage, examen de la couleur des emballages primaire et secondaire, de la forme galénique ainsi que de la notice trouvée dans l'emballage.

IV.4.1.2. Densité des Suspensions buvables

La procédure ci-après a été suivie (USP, 2018) : à l'aide d'une balance analytique, tarer un ballon jaugé de 5,0 mL vide, remplir et amener au trait avec la Suspension ou sirop, peser le ballon jaugé rempli et déterminer la densité de la Suspension ou de la solution ($d = \text{masse (g)} / \text{volume (mL)}$).

IV.4.1.3. Volume à reconstituer des Suspensions buvables

Tenir compte du facteur de correction (F) pour la température en relation avec la masse d'eau correspondant à 1 litre d'eau si cette température diffère de 20°C. Utiliser l'eau milli-Q stockée dans un Berlin et placée au moins 15 h dans le local des balances. Mesurer la température de cette eau lors du test.

Suivre le mode opératoire suivant (USP, 2018):

- Tarer un flacon d'un échantillon à l'analyse (considérer comme M_2) ;

- Ajouter de l'eau jusqu'au trait de marque indiqué sur le flacon et fermer avec son bouchon ;
- Mélanger
- Peser à nouveau le flacon (considérer comme M_3).
- Calculer le volume V_1 jusqu'au trait de marque comme suit :

$$V_1 \text{ (mL)} = [M_3 \text{ (en g)} - M_2 \text{ (en g)}] \times F$$

Où :

- V_1 = volume (en mL) jusqu'au trait de marque
- F = facteur de correction de la température
- Calculer le pourcentage de V_1 en comparant avec le volume (V_0) déclaré par le fabricant comme suit : $\% V_1 = \frac{V_1 \text{ (en mL)}}{V_0 \text{ (en mL)}} \times 100$

Limite d'acceptation : Supérieur à 90 % du volume déclaré par le fabricant (USP, 2015).

IV.4.2. Tests pharmacotechniques

IV.4.2.1. Uniformité de masse

Pour les comprimés :

- A l'aide d'une balance analytique, peser individuellement 20 comprimés, prélevés au hasard et déterminer la masse moyenne
- Calculer les écarts limites de la moyenne en % et comparer aux exigences (tableau IV) (Pharmacopée Européenne, 2020).

Pour les gélules :

- Peser une gélule pleine sans perdre de fragments de l'enveloppe, ouvrir la capsule ;
- La vider aussi complètement que possible ;
- Peser l'enveloppe et calculer la masse du contenu par différence ;
- Répéter l'opération sur 19 autres capsules ;
- Calculer les écarts limites de la moyenne admis en % et comparer aux exigences (Pharmacopée Européenne, 2020).

Tableau IV. Ecartés limites en pourcentage de la moyenne admise pour mesurer l'uniformité de masse des comprimés et gélules.

Forme pharmaceutique	Masse moyenne (\bar{x})	Ecartés limites de la moyenne admis (%)
Comprimés non enrobés	≤ 80 mg	10
] 80 mg; 250 mg [7,5
	≥ 250 mg	5
Capsules	< 300 mg	10
	≥ 300 mg	7,5

Spécifications (Pharmacopée Européenne, 2020) :

- Au plus 2 unités peuvent s'écarter de la masse moyenne d'un pourcentage indiqué
- La masse d'aucune unité ne peut s'écarter du double de ce pourcentage. Si le premier essai ne satisfait pas aux spécifications, il faut reprendre le test avec 10 autres unités.

IV.4.2.2. Test de variation de masse

Déterminer la valeur d'acceptation (AV : *Acceptance Value*) en suivant la procédure ci-après (USP, 2018) :

- Peser individuellement 10 comprimés et calculer la teneur estimée individuelle de 10 comprimés à partir de l'équation : $x_i = \frac{A}{w} \times w_i$

Où :

- x_i = teneur estimée de chaque comprimé ou gélule
- A = résultat du dosage de principe actif réalisé sur le mélange de 10 comprimés ou gélules
- w = masse moyenne de 10 comprimés ou gélules
- w_i = masse de chaque comprimé ou gélule

N.B : Pour les gélules peser individuellement 10 gélules pleines, ouvrir les 10 gélules et les vider. Peser individuellement, les 10 gélules vides et calculer la masse du contenu par différence.

Déterminer la valeur d'acceptation (AV : *Acceptance Value*) de la manière ci-après :

- 1^{er} cas : si $98,5\% \leq \bar{x} \leq 101,5\%$, alors AV = ks
- 2^{ème} cas : si $\bar{x} \leq 98,5\%$ alors AV = $98,5 - \bar{x} + ks$

- 3^{ème} cas : si $\bar{x} > 101.5 \%$, alors $AV = \bar{x} - 101,5 + ks$

Où :

- \bar{x} = Moyenne de la valeur estimée individuelle de 10 comprimés ou gélules exprimé en % de la teneur déclarée ;
- k = Constante d'acceptabilité (k = 2,4 pour n = 10 et k = 2,0 pour n = 30)
- s = Ecart type

Limites d'acceptation : $AV \leq 15,0 \%$

Si AV est supérieur à 15,0 %, recommencer l'essai avec 20 autres comprimés ou gélules et recalculer l'AV comme indiqué ci-dessus. L'AV final de 30 comprimés ou gélules doit être inférieur ou égal à 15 (USP, 2018).

Comparativement à l'uniformité de masse, cet essai se réalise sur 10 unités, en cas de non conformité, l'essai doit être repris avec 20 autres unités. Nous avons évalué ce test par la détermination de l'AV (*Acceptance Value*) qui ne doit pas être supérieur à 15.

IV.4.2.2. Test de désagrégation

Les conditions expérimentales suivantes ont été préalablement définies :

- Température : 37°C,
- Volume : 700 mL,
- Durée de l'opération : 30 minutes,
- Tour par minute : 30 tours/minutes

Après que ces conditions soient définies, la procédure ci-après a été suivie :

- Placer le liquide d'immersion dans les deux vases cylindriques ;
- Attendre la fin de l'étape du préchauffement de liquide d'immersion puis lancer l'analyse une fois la température voulue est atteinte ;
- Une fois la température fixée (37°C) atteinte, placer une unité de l'échantillon à examiner dans chacun des six tubes cylindriques transparents et démarrer l'analyse ;
- Au temps indiqué, remonter le porte-tube hors du liquide d'immersion et examiner l'état des unités soumises à l'essai.

Toutes les unités sont complètement désagrégées. Si un ou deux d'entre elles ne sont pas désagrégées, répéter l'essai sur 12 unités supplémentaires. Les exigences de l'essai sont satisfaites si au moins 16 des 18 unités soumises à l'essai sont désagrégées (Pharmacopée Européenne, 2020).

Le tableau V reprend les spécifications relatives au temps de désagrégation de différentes formes galéniques.

Tableau V. Spécifications relatives au temps de désintégration des formes galéniques

Formes galéniques	Milieu	Spécifications
Comprimés conventionnels	Eau à 37°C	< 15 minutes
Comprimés recouverts d'un enrobage ordinaire	Eau à 37°C	< 60 minutes
Gélules	Eau à 37°C	< 30 minutes
Comprimés dispersibles	Eau à 15-25 °C	< 3 minutes
Comprimés et capsules gastro-résistantes	HCl	> 120 minutes

IV.4.2.3. Test de friabilité

Le mode opératoire ci-après a été suivi :

- Prélever 10 comprimés entiers soigneusement dépoussiérés avant l'essai
- Peser exactement l'échantillon et placer les comprimés dans le tambour
- Procéder à 100 rotations (25 rotations par minutes pendant quatre minutes), puis sortir les comprimés du tambour, éliminer les poussières libres comme précédemment et peser à nouveau exactement.

Si, au terme du cycle de rotations, l'échantillon comporte des comprimés visiblement fêlés, fissurés ou cassés, il ne satisfait pas à l'essai. Si les résultats sont difficiles à interpréter ou si la perte de masse est supérieure à la valeur cible, répéter l'essai à deux reprises et calculer la moyenne des trois résultats. Pour la plupart des produits, la perte de masse maximale (résultant d'un seul essai ou de la moyenne de 3 essais) considérée comme acceptable est de 1,0 pour cent (Pharmacopée Européenne, 2020).

IV.4.2.4. Test de résistance à la rupture des comprimés

Mode opératoire :

- Placer le comprimé entre les mâchoires en tenant compte, le cas échéant, de sa forme, de la barre de cassure et de la gravure ; pour chaque détermination,
- Orienter le comprimé de la même façon par rapport à la direction d'application de la force.

- Effectuer la mesure sur 10 comprimés, en prenant soin d'éliminer tout débris de comprimés avant chaque détermination

Les spécifications relatives au test de dureté ne sont reprises dans aucun référentiel. Toutefois, elles dépendent de chaque fabricant par rapport à sa préparation et celui-ci a l'obligation d'indiquer ses propres spécifications dans son dossier de demande d'autorisation sur le marché adressé à l'Agence de Médicaments.

Dans le cadre de cette étude, nous avons interprété nos résultats en calculant (Nnanga *et al.*, 2016):

- La dureté moyenne constatée
- Le coefficient de variation (CV)
- La limite de contrôle supérieur (LCS)
- La limite de contrôle inférieur (LCI)

La LCS est obtenu en multipliant la dureté moyenne par 1,1, alors qu'avec la LCI nous multiplions la dureté moyenne par 0,9. Les comprimés sont conformes si aucune des valeurs obtenues n'est supérieure à la LCS calculée et inférieure à la LCI calculée.

IV.4.3. Identification de substances actives

Elle a consisté à confirmer la présence de la substance active dans le médicament telle que déclarée sur l'emballage. Toutes les substances actives ont été identifiées par chromatographie liquide à haute performance. L'identification s'est basée sur

- la similarité des temps de rétention (R_t) (voir la méthode de dosage) ;
- le temps de rétention du pic d'azithromycine, de céfadroxyl, de céfixime, de chloramphénicol d'érythromycine et de tétracycline de la solution d'échantillon devrait correspondre à celui de la solution de référence (USP, 2018) :

$$\Delta = |R_{tEchantillon}(min) - R_{tRéférence}(min)|$$

Limites d'acceptation : $\Delta \leq 0.5 \text{ min}$

Un test d'identification complémentaire a été effectué en se basant sur la similarité des spectres UV extraits à l'apex des pics. Les spectres UV du pic des analytes obtenus avec les solutions d'échantillon et de substance de référence doivent être visiblement superposables.

IV.4.4. Dosage des principes actifs

Les méthodes validées dans ce travail ont été utilisées pour doser nos échantillons en vue de confirmer et de consolider leur utilisation en routine. A cet effet, la chromatographie liquide à haute performance et la spectrophotométrie UV ont permis de déterminer la teneur en principe actif des antibiotiques étudiés.

Dans les points qui suivent, nous présentons les modes opératoires qui nous ont permis de doser les échantillons collectés.

IV.4.4.1. Dosage par HPLC

IV.4.4.1.1. Azithromycine et érythromycine

Dans le tableau VI, nous présentons les conditions chromatographiques du dosage de l'azithromycine et l'érythromycine par HPLC.

Tableau VI. Conditions chromatographiques appliquées au dosage de l'azithromycine et de l'érythromycine

Caractéristiques de colonne	<i>xBridge</i> C18 (100 mm x 4,6 mm diamètre ; dimension des particules, 3,5 µm)
Phase mobile	Méthanol/tampon acétate d'ammonium : 80÷20
Temps d'analyse	5 min (érythromycine), 10 min (azithromycine)
Débit	1 mL/min
Volume d'injection	10 µL
Température du four	35°C
Détection	PDA 220nm
Compartiment d'échantillon	15°C
pH du tampon	10,0 (Tamponné par du NaOH dilué)

a) Préparation de la solution tampon

- Dans un Berlin taré de 1000 mL, peser 0,77 g d'acétate d'ammonium ;
- Ajouter environ 100 mL d'eau milli Q et agiter jusqu'à la dissolution complète ;
- Transférer cette solution dans un ballon jaugé de 1000 mL puis porter au volume avec l'eau milli Q ;
- Ajuster à pH 10,0 avec une solution d'hydroxyde de sodium 0,1N ;

b) Préparation des solutions de référence

Un même mode opératoire a été suivi pour l'azithromycine et l'érythromycine :

- Dans un ballon jaugé taré de 10 mL, peser précisément environ 50 mg d'azithromycine/érythromycine ;
 - Ajouter environ 5 mL de méthanol, agiter et placer dans le bain à ultrason pendant 5 min afin d'obtenir une dissolution complète de la poudre. Porter au volume avec le même solvant ;
 - Diluer cette solution cinq fois avec un mélange méthanol : eau (98 :2 v/v) pour obtenir une concentration finale d'environ 1000 µg/mL de deux macrolides.
- c) Préparation des solutions d'échantillons

Préparer comme suit deux solutions indépendantes de chaque formulation pharmaceutique :

Pour les comprimés

- Déterminer le poids moyen des 20 comprimés de la manière suivante : peser individuellement 20 comprimés, les placer dans un mortier bien sec et propre. Calculer la masse moyenne des 20 comprimés ;
- Pulvériser 20 comprimés jusqu'à obtenir une poudre homogène ;
- Dans un ballon jaugé taré de 10,0 mL, dissoudre une masse correspondante à 50 mg dans le méthanol puis porter au volume avec le même solvant. Diluer cinq fois cette solution avec le mélange méthanol : eau (98 :2, v/v) ;
- Filtrer une portion de ces solutions d'échantillon à travers un filtre en PTFE de 0,45µm ;
- Etiqueter les deux solutions d'essai conformément au code attribué pour chaque échantillon.

Pour les Suspensions buvables :

- Ajouter l'eau milli Q dans la Suspension buvable jusqu'au trait indiqué par le fabricant,
- Déterminer la densité de la suspension buvable comme au point indiquée au point IV.4.1.1. pour obtenir la masse à peser ; la densité a été multipliée par le volume qui correspond à la prise d'essai selon le dosage déclaré de la substance active par le fabricant.
- Diluer une masse de la Suspension buvable de l'échantillon d'azithromycine et d'érythromycine (voir ci-dessous) de manière quantitative et par étapes dans le

méthanol puis dans un mélange méthanol : eau (98 :2, v/v) pour obtenir une solution contenant nominalelement 1000 µg/mL d'azithromycine et d'érythromycine :

- Pour la poudre déclarée à 250 mg : dans un ballon jaugé taré de 10,0 mL, transférer une masse équivalente à 1,0 mL dans le méthanol puis porter au volume avec le même solvant. Diluer cinq fois cette solution.
- Pour la poudre déclarée à 500 mg, dans un ballon jaugé taré de 10,0 mL, transférer une masse équivalente à 0,5 mL dans le méthanol puis porter au volume avec le même solvant. Diluer cinq fois cette solution avec le mélange méthanol : eau (98 :2, v/v).
- Filtrer une portion de ces solutions d'échantillon à travers un filtre en PTFE (polytétrafluoroéthylène) de 0,45 µm.
- Etiqueter les deux solutions d'essai conformément au code attribué pour chaque échantillon.

IV.4.3.2. Céfadroxyl et chloramphénicol

Dans le tableau VII, nous présentons les conditions chromatographiques ayant permis de doser le céfadroxyl et le chloramphénicol par CLHP.

Tableau VII. Conditions chromatographiques appliquées au dosage de céfadroxyl et chloramphénicol

Caractéristiques de colonne	<i>x</i> Bridge C18 (100 mm x 4,6 mm diamètre, dimension des particules 3,5 µm)
Phase mobile	Méthanol/tampon acétate d'ammonium : 95÷5
Temps	5 min (céfadroxyl), 15 min (chloramphénicol)
Débit	1 mL/min
Volume d'injection	10 µL
Température du four	25°C
Détection	PDA 220nm
Compartiment d'échantillon	15°C
pH du tampon	6,0 (tamponné avec HCl dilué)

- a) Préparation de la solution tampon (comme pour azithromycine et érythromycine)
- b) Préparation des solutions de référence

Le mode opératoire ci-après a été suivi :

- Dans un ballon jaugé taré de 20,0 mL, peser précisément environ 20 mg de céfadroxyl. Pour chloramphénicol, dans un ballon jaugé de 20 mL taré, peser précisément environ 40 mg de chloramphénicol ;
 - Ajouter environ 5 mL de méthanol, agiter et placer au bain à ultrason pendant 5 min afin d'obtenir une dissolution complète de la poudre. Porter au volume avec le même solvant
 - Diluer cette solution en utilisant le mélange méthanol : eau (98 :2 v/v) afin d'obtenir une concentration finale d'environ 50 µg/mL pour le céfadroxyl et 200 µg/mL pour le chloramphénicol.
- c) Préparation des solutions d'échantillons

Pour les gélules

- Déterminer le poids moyen des 20 gélules de la manière suivante : peser individuellement 20 gélules pleines, les ouvrir et les vider en plaçant la poudre dans un mortier bien sec et propre. Peser individuellement, les 20 gélules vides et calculer la masse du contenu par différence pour déterminer la masse moyenne de la poudre obtenue ;
- Mélanger la poudre placée dans le mortier de manière à obtenir une poudre homogène ;
- Pour le céfadroxyl, dans un ballon jaugé taré de 20,0 mL, transférer une masse correspondant à 20 mg dans le méthanol, placer au bain à ultrason pendant 5 minutes et agiter à l'aide d'un vortex (5 min) afin d'obtenir une dissolution complète de la poudre, puis porter au volume avec le même solvant. Diluer 20 fois cette solution avec le mélange méthanol : eau (98 :2, v/v).
- Pour le chloramphénicol, dans un ballon jaugé taré de 20,0 mL, transférer une masse correspondante à 40 mg dans le méthanol, placer au bain à ultrason pendant 5 minutes et agiter à l'aide d'un vortex (5 minutes) afin d'obtenir une dissolution complète de la poudre, puis porter au volume avec le même solvant. Diluer 10 fois cette solution avec le mélange méthanol : eau (98 :2, v/v) ;
- Filtrer une portion de ces solutions d'échantillon à travers un filtre en PTFE de 0,45µm ;
- Etiqueter les solutions d'essai conformément au code attribué pour chaque échantillon.

Pour les comprimés

- Déterminer le poids moyen de 20 comprimés de la manière suivante : peser individuellement 20 comprimés, les placer dans un mortier bien sec et propre. Calculer la masse moyenne de 20 comprimés ;
- Procéder à la pulvérisation des 20 comprimés jusqu'à obtenir une poudre homogène ;
- Dans un ballon jaugé taré de 20,0 mL, dissoudre une masse correspondant à 20 mg de céfadroxyl dans le méthanol, agiter à l'aide d'un vortex (5 min) et placer au bain à ultrason pendant 5 minutes afin d'obtenir une dissolution complète de la poudre, puis porter au volume avec le même solvant. Diluer 20 fois cette solution avec le mélange méthanol : eau (98 :2, v/v) ;
- Filtrer une portion de ces solutions d'échantillon à travers un filtre en PTFE de 0,45 μ m ;
- Etiqueter les deux solutions d'essai conformément au code attribué pour chaque échantillon ;

Pour les suspensions buvables :

- Ajouter l'eau milli Q dans la suspension buvable jusqu'au trait indiqué par le fabricant ;
- Déterminer la densité de la suspension buvable tel qu'indiqué au point IV.4.1.1.;
- Diluer une masse de la suspension buvable de céfadroxyl (voir ci-dessous) de manière quantitative et par étapes dans le méthanol puis dans un mélange méthanol : eau (98 : 2, v/v) pour obtenir une solution contenant nominalelement 50 μ g/mL de céfadroxyl :
- Pour la poudre déclarée à 250 mg de céfadroxyl, dans un ballon jaugé taré de 20 mL, transférer une masse équivalant à 0,4 mL de la suspension dans le méthanol, placer au bain à ultrason pendant 5 min et agiter à l'aide d'une centrifugeuse (5 min) afin d'obtenir une dissolution complète de la suspension puis porter au volume avec le même solvant. Diluer 20 fois cette solution avec le mélange méthanol : eau (98 :2, v/v).
- Filtrer une portion de ces solutions d'échantillon à travers un filtre en PTFE (polytétrafluoroéthylène) de 0,45 μ m.
- Etiqueter les deux solutions d'essai conformément au code attribué pour chaque échantillon.

Toutes les solutions des échantillons ont été préalablement soumises à une centrifugation (274 g pendant 5 min) puis filtrées à travers un filtre en PTFE de 0.45 µm avant d'être injectées à la chaîne CLHP.

Il convient de signaler qu'avant de lancer la séquence d'injection de dosage, le SST (*System Suitability Test*) qui établit la conformité du système chromatographique est vérifiée en déterminant le facteur de symétrie (AS) à partir de la base du pic chromatographique de l'analyte. L'équation suivante est appliquée (Pharmacopée Européenne, 2016) :

$$AS = W_{0.05} / 2f$$

Où :

- $W_{0.05}$ = la largeur du pic à 5 % de sa hauteur ;
- f = la distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum du pic et le bord d'entrée du pic au vingtième de sa hauteur.

Si le SST est conforme, la séquence de dosage est autorisée. Si le SST n'est pas conforme, alors vérifier le système chromatographique et effectuer à nouveau les tests SST.

La séquence d'injection pour le dosage était la suivante :

- Injection 1 : diluant (injection du blanc qui est le mélange méthanol : eau (98% :2% v/v))
- Injection 2-4 : Réf. 1 pour la solution SST
- Injection 5-7 : Réf. 2 pour la solution SST
- Injection 8-10 : Solution 1 de l'échantillon Xa
- Injection 11-13 : Solution 2 de l'échantillon Xb
- Injection 14-16 : Réf. 1 pour la solution SST
- Injection 17-19 : Réf. 2 pour la solution SST
- Injection 20 : diluant (injection du blanc qui est le mélange méthanol : eau (98% :2% v/v))

Les écarts types relatifs (RSD) pour six injections de la Ref.1 et de la Ref.2 ne doivent pas être supérieurs à 2.0 %. Les recouvrements individuels de la Ref.2 par rapport à la Ref.1 ne doivent pas non plus être supérieurs à 2 % :

$$\text{Recouvrement (\%)} = \frac{A_{R2}}{C_{R2}} \times \frac{C_{R1}}{A_{R1}} \times 100$$

Où :

- A_{R2} = la réponse du pic d'analyte de la solution de référence 2 ;
- C_{R2} = la concentration (en µg/mL) d'analyte de la solution de référence 2 ;

- AR_1 = moyenne des réponses de pic d'analyte de la solution de référence 1 pour 6 injections ;
- CR_1 = concentration (en $\mu\text{g/mL}$) d'analyte dans la solution de référence 1

Le pourcentage de la substance active par rapport à la teneur déclarée sur l'étiquette du principe actif dans l'échantillon était ensuite calculé de la manière suivante :

$$\% = \frac{A_S}{A_{R1}} \times \frac{C_{R1}}{C_S} \times 100 \times \text{pureté}$$

Où :

- A_S = moyenne des réponses du pic d'analyte de la solution d'échantillon pour les 3 injections ;
- C_S = concentration théorique ($\mu\text{g/mL}$) d'analyte dans la solution d'échantillon ;
- A_R = moyenne des réponses du pic d'analyte de la solution de référence pour les 6 injections ;
- C_R = concentration ($\mu\text{g/mL}$) d'analyte dans la solution de référence.

Par ailleurs, nous avons, appliquée la méthode de dosage HPLC décrite dans la Pharmacopée Américaine pour comparer les resultats obtenus à partir des échantillons à base de l'azithromycine, céfadroxil, céfixime et érythromycine présentés en suspension buvable. En effet, la matrice préparée dans ce travail n'a pris en compte que celle qui entre communement dans la formulation des comprimés et des gélules. Les conditions chromatographiques utilisées sont résumées dans le tableau VIII (USP, 2018).

Tableau VIII. Conditions chromatographiques pour l'azithromycine, le céfadroxil, le céfixime et érythromycine selon la Pharmacopée Américaine

Azithromycine	
Phase mobile	Acétonitrile/ tampon KH_2PO_4 0,01 M : 71÷9
Débit	1,5 mL/min
Volume d'injection	50 μL
Température du four	50°C
Détection	PDA 220nm
Compartiment d'échantillon	15°C
pH du tampon	11 (ajusté avec KOH 10 N)
Céfadroxil	
Phase mobile	Acétonitrile/tampon KH_2PO_4 0,05 M : 4÷96
Débit	1,5 mL/min
Volume d'injection	10 μL
Température du four	25°C
Détection	PDA 230nm
Compartiment d'échantillon	15°C

pH du tampon	5 (ajusté avec KOH 10 N)
Céfixime	
Phase mobile	Acétonitrile/hydroxyde de tétrabutylammonium 0,4 M:10÷30
Débit	1 mL/min
Volume d'injection	10 µL
Température du four	40°C
Détection	PDA 254 nm
Compartiment d'échantillon	15°C
pH du tampon	6,5 (ajusté avec acide phosphorique 1,5M)
Erythromycine	
Phase mobile	Acétonitrile/tampon phosphate 0,01 M: 70÷30
Débit	1 mL/min
Volume d'injection	10 µL
Température du four	40°C
Détection	PDA 220 nm
Compartiment d'échantillon	15°C
pH du tampon	11 (ajusté avec acide phosphorique 1,5M)

Pour azithromycine, le mode opératoire ci-après a été suivi :

- Prélever une masse correspondant à 40 mg d'azithromycine
- Dans un ballon jaugé de 100 mL, dissoudre cette masse à l'aide d'un mélange de tampon phosphate : alcool isopropylique : éthanol : acétonitrile (53 :20 :16 :11)
- Centrifuger cette solution et recueillir le surnageant
- Transférer 1 mL de cette solution dans un ballon jaugé de 100 mL
- Porter au volume en utilisant la phase mobile : acétonitrile : tampon (KH₂PO₄) (4 :96).

La solution tampon a été préparée en dissolvant 5,8 g de KH₂PO₄ dans 3000 mL dont 2130 mL d'eau et 870 mL d'acétonitrile.

Pour le céfadroxil :

- Prélever une quantité correspondant à 50 mg de céfadroxil
- Dans un ballon jaugé de 50 mL, dissoudre cette masse dans une solution aqueuse de KH₂PO₄ ajustée à pH 5.

La solution tampon a été préparée en dissolvant 6,86 g de KH₂PO₄ dans 1000 mL d'eau milli Q.

Pour le céfixime :

- Prélever une quantité correspondant à 50 mg de céfixime
- Dans un ballon jaugé de 25 mL, dissoudre dans une solution aqueuse de Na₂HPO₄ ajustée à pH 7

- Cette solution aqueuse a été préparée en dissolvant 13,6 g de Na_2HPO_4 dans 1000 mL d'eau milli Q.

Pour l'érythromycine :

- Prélever une masse correspondante à 40 mg d'azithromycine
- Dans un ballon jaugé de 100 mL, dissoudre cette masse dans l'acétonitrile
- Centrifuger cette solution et recueillir le surnageant
- Transférer 1 mL de cette solution puis le placer dans un ballon jaugé de 100 mL
- Porter au volume en utilisant l'acétonitrile.

IV.4.3.2. Dosage par spectrophotométrie UV visible

IV.4.3.2.1. Préparation des solutions étalons

La préparation des solutions étalons a été réalisée en vue de doser l'échantillon analysé à partir d'une droite de régression d'équation : $y = ax + b$:

$$x = (y-b) / a$$

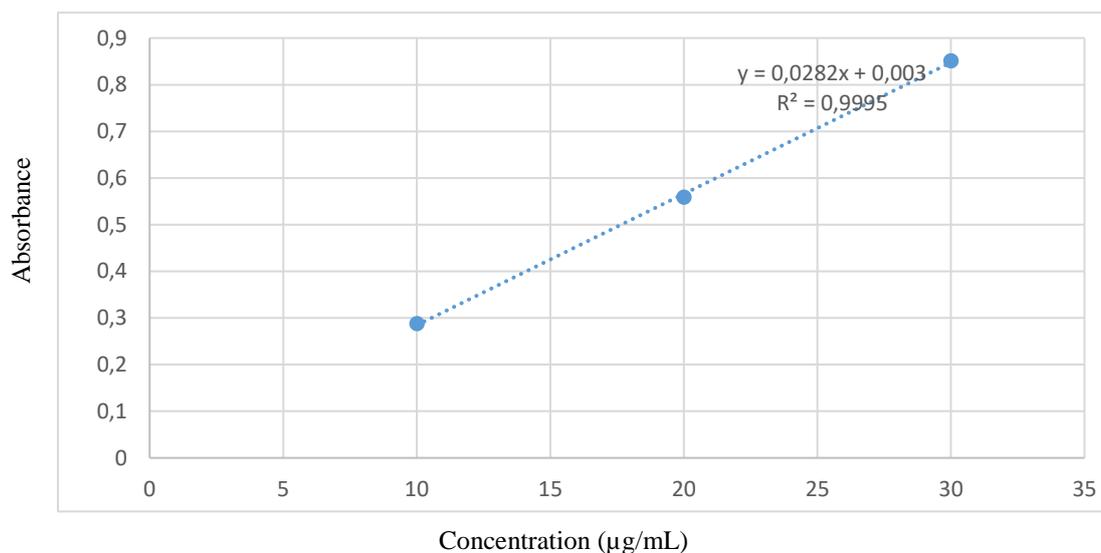
Où : x = concentration de l'échantillon ; y = absorbance de l'échantillon ; b = ordonnée à l'origine ; a = la pente de la droite.

a) Chloramphénicol

Dans un ballon jaugé taré de 20,0 mL, dissoudre 20 mg de chloramphénicol dans l'eau puis porter au volume avec le même solvant. Diluer 100, 50 et 33 fois (tableau IX) cette solution pour obtenir des solutions filles à 10, 20 et 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Procéder à la mesure des absorbances de ces solutions à l'aide d'un spectrophotomètre UV à 271 nm. A partir d'une feuille de calcul Excel, tracer une droite de régression comme l'illustre la figure 8.

Tableau IX. Dilution des étalons pour tracer la droite de régression de chloramphénicol

Solutions filles	Rapport de dilution	Volume total (mL)	Solution mère (mL)	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbance (n=3)
Solution 1	0,5 mL/50 mL	50	0,5	10	0,288 \pm 0.0005
Solution 2	1mL/50 mL	50	1	20	0,559 \pm 0.0005
Solution 3	1,5mL/50 mL	50	1,5	30	0,851 \pm 0.0005

**Figure 8. Droite de régression pour le dosage de chloramphénicol par spectrophotométrie UV-Vis**

b) Tétracycline

Dans un ballon jaugé taré de 20 mL, dissoudre 20 mg de tétracycline dans l'eau puis porter au volume avec le même solvant. Diluer 200, 100 et 67 fois (tableau X) cette solution pour obtenir des solutions filles à 5, 10 et 15 $\mu\text{g/mL}$. Mesurer à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible à 276 nm.

Tableau X. Dilution des étalons pour tracer la droite de régression de tétracycline

Solutions filles	Rapport de dilution	Volume total (mL)	Solution mère (mL)	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbance (n=3)
Solution 1	0,5 mL/100 mL	100	0,5	5	0,226 \pm 0.007
Solution 2	1mL/100 mL	100	1	10	0,447 \pm 0.009
Solution 3	1,5mL/100 mL	100	1,5	15	0,668 \pm 0.007

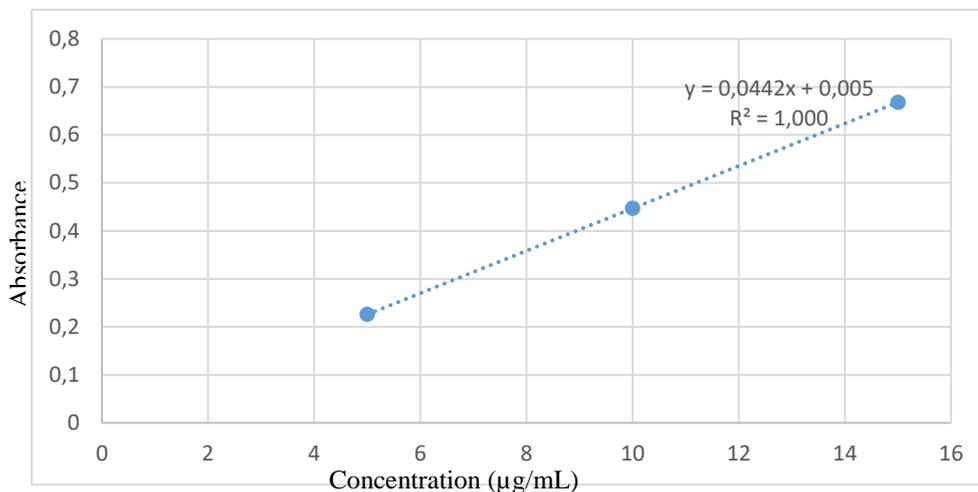


Figure 9. Droite de régression pour le dosage de tétracycline par spectrophotométrie UV-vis

c) Erythromycine

Dans un ballon jaugé taré de 10 mL, dissoudre 20 mg d'érythromycine dans le méthanol puis porter au volume avec le même solvant. Diluer 8, 4 et 2.67 fois (tableau XI) cette solution pour obtenir des solutions filles à environ 250, 500 et 750 µg/mL. Mesurer ces solutions à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible à 215 nm.

Tableau XI. Dilutions des étalons pour tracer la droite de régression d'érythromycine

Solutions filles	Rapport de dilution	Volume total (mL)	Solution mère (mL)	Concentration (µg/mL)	Absorbance (n=3)
Solution 1	2,5mL/20 mL	20	0,5	250	0,282±0,006
Solution 2	5mL/20 mL	20	1	500	0,56±0,007
Solution 3	7,5mL/20 mL	20	1,5	750	0,859±0,006

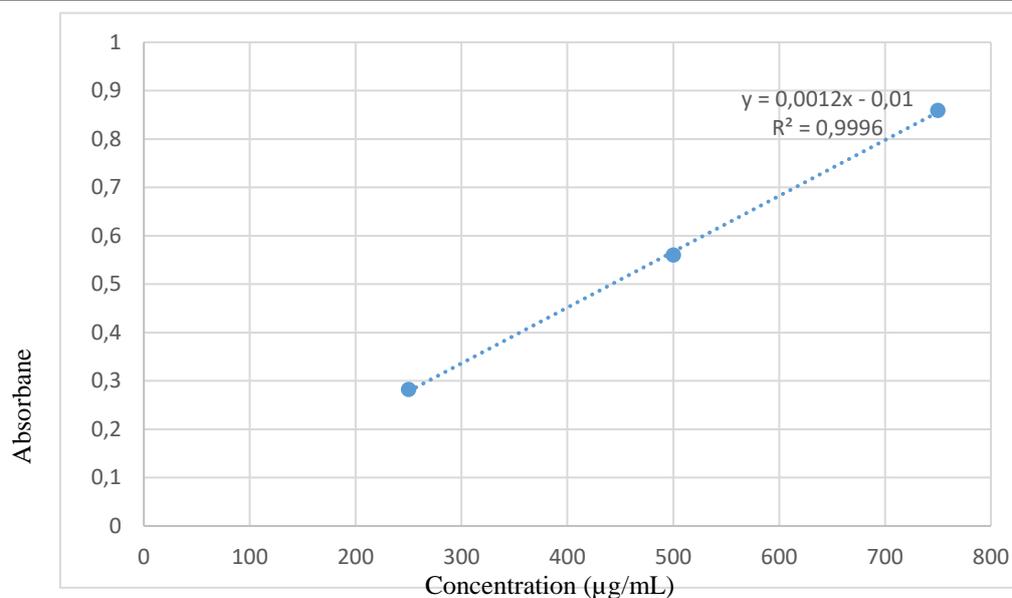


Figure 10. Droite de régression pour le dosage d'érythromycine par spectrophotométrie UV-Vis

d) Céfixime

La méthode des ajouts dosés a été mise à profit pour déterminer la teneur en céfixime de nos échantillons. Le protocole a été réalisé en trois étapes :

1. Préparation de la solution stock de l'échantillon de céfixime

Dans un ballon taré de 20 mL, peser une masse correspondante à 20 mg de céfixime. Ajouter 5 mL d'eau puis agiter jusqu'à la dissolution complète de la poudre. Porter au volume avec le même solvant. Appeler cette solution S_1 .

2. Préparation de la solution de référence de céfixime

Dans un ballon taré de 20 mL, peser 20 mg du standard de céfixime. Ajouter 5 mL d'eau puis agiter jusqu'à la dissolution complète de la poudre. Porter au volume avec le même solvant. Appeler cette solution S_2 .

3. Mélange de la solution S_1 et S_2

Transférer un volume identique (1 mL) de la solution S_1 dans 6 ballons jaugés de 50 mL. Dans ces six derniers, transférer à nouveau le volume croissant de la solution S_2 comme suit :

- Dans le premier ballon jaugé ne rien ajouter (il n'y a que le 1 mL de la solution S_1)
- Dans le deuxième, ajouté 1 mL de la solution S_2
- Dans le troisième, ajouter 1.5 mL de la solution S_2
- Dans le quatrième, ajouter 2 mL de la solution S_2
- Dans le cinquième, ajouter 2.5 mL de la solution S_2
- Dans le sixième, ajouter 3 mL de la solution S_2

Porter au volume les six ballons jaugés en utilisant l'eau comme diluant. Mesurer l'absorbance de ces six solutions à 220 nm. Déterminer la concentration du standard de céfixime ajoutée dans chaque ballon jaugé (tableau XII). Tracer un graphique avec en Y la concentration de standard de céfixime ajoutée et en X la réponse mesurée pour chaque ballon jaugé. Nous avons choisi cette façon de tracer nos courbes d'étalonnage, car elle nous permet d'obtenir en même temps la concentration et l'écart type.

Tableau XII. Dilution des étalons et échantillon de céfixime (CFX001) pour tracer la droite de régression

Solutions filles	Volume final (mL)	Volume solution de référence (mL)	Concentration en standard ajoutée dans le ballon jaugé ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbance
Sol ₁	50	0	0	0,302 \pm 0,008
Sol ₂	50	1	20	0,589 \pm 0,006
Sol ₃	50	1,5	30	0,725 \pm 0,008
Sol ₄	50	2	40	0,856 \pm 0,007
Sol ₅	50	2,5	50	0,991 \pm 0,006
Sol ₆	50	3	60	1,147 \pm 0,007

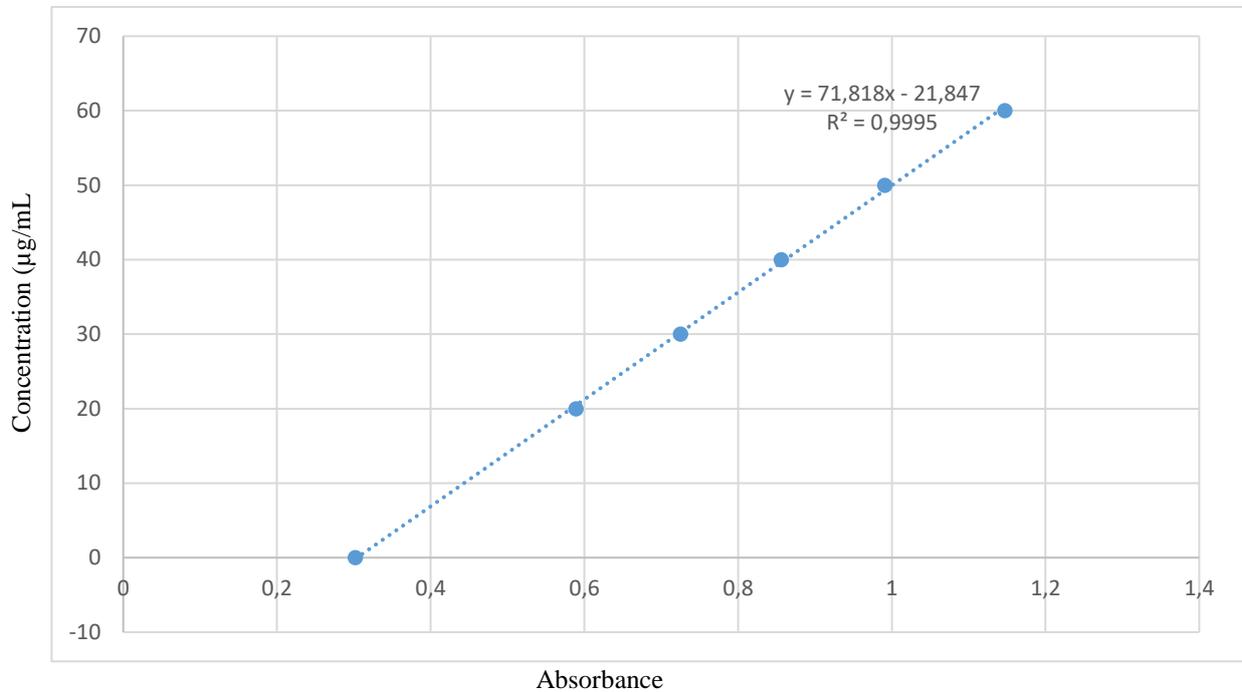


Figure 11. Droite de régression pour le dosage de l'échantillon CFX001 par spectrophotométrie UV-Vis en utilisant la méthode des ajouts dosés.

Le tableau XIII indique les valeurs de la pente, ordonnée à l'origine et coefficient de détermination pour les échantillons (n=36) à base de céfixime qui ont été analysés.

Tableau XIII. Valeurs de la pente, ordonnée à l'origine et coefficient de détermination des échantillons de céfixime

Echantillon	Pente	Ordonnée à l'origine	Coefficient de détermination
CFX001	71,818	21,847	0,9995
CFX002	67,443	12,505	0,9832
CFX003	66,919	15,808	0,9901
CFX004	69,815	18,656	0,9882
CFX005	67,722	16,793	0,9951
CFX006	67,736	18,18	0,9966
CFX007	66,496	18,334	0,9875
CFX008	67,155	16,16	0,999
CFX009	67,435	21,941	0,9984
CFX010	67,424	21,786	0,9975
CFX011	68,493	20,525	0,9967
CFX012	66,65	15,588	0,9937
CFX013	66,487	20,975	0,9897
CFX014	67,839	22,453	0,9927
CFX015	65,942	14,53	0,9867
CFX016	69,031	19,015	0,9938
CFX017	68,64	15,916	0,9896
CFX018	70,933	18,778	0,9900
CFX019	72,546	19,129	0,9933
CFX020	71,959	18,189	0,9893
CFX021	67,024	17,482	0,9857
CFX022	67,376	17,749	0,9964
CFX023	69,273	19,106	0,9963
CFX024	68,983	17,748	0,9963
CFX025	67,839	18,439	0,9980
CFX026	67,704	17,106	0,9935
CFX027	67,739	16,602	0,9916
CFX028	71,004	18,251	0,9951
CFX029	65,059	14,084	0,9913
CFX030	69,426	18,736	0,9983
CFX031	71,034	20,747	0,9976
CFX032	69,843	20,283	0,9976
CFX033	67,96	19,494	0,9904
CFX034	66,282	19,051	0,9895
CFX035	69,7143	18,243	0,9996
CFX036	72,54	21,06	0,9959

V.4.3.2.1. Préparation des échantillons

De manière générale, les échantillons ont été dissous puis dilués pour atteindre une concentration de 10, 20, 40 et 500 µg/mL respectivement pour la tétracycline, le chloramphénicol, la céfixime et l'érythromycine. L'eau a été utilisée comme diluant pour la tétracycline, céfixime et chloramphénicol, alors que le méthanol a été utilisé pour la préparation des échantillons d'érythromycine. La prise d'essai correspondait à 20 mg pour toutes les substances actives.

Dans les tableaux de XIV à XVIII, nous reprenons les prises d'essai par échantillon en fonction de la forme galénique des échantillons.

Tableau XIV. Prise d'essai par échantillon en fonction de la teneur déclarée en tétracycline et de la masse moyenne des gélules

Echantillon	Dosage déclaré (g)	Masse moyenne (g)	Masse pesée (g)
TRC001	0,2500	0,3527 ± 0,0224	0,0282
TRC002	0,2500	0,3433 ± 0,0417	0,0275
TRC003	0,2500	0,3156 ± 0,0343	0,0252
TRC004	0,2500	0,3111 ± 0,0553	0,0249
TRC005	0,2500	0,3025 ± 0,0741	0,0242
TRC006	0,2500	0,3245 ± 0,0434	0,0260
TRC007	0,2500	0,3330 ± 0,0463	0,0266
TRC008	0,2500	0,3401 ± 0,0344	0,0272

Tableau XV. Prise d'essai par échantillon en fonction de la teneur déclarée en chloramphénicol et de la masse moyenne des gélules

Echantillon	Dosage déclaré (g)	Masse moyenne (g)	Masse pesée (g)
CHL001	0,2500	0,3159 ± 0,0006	0,0253
CHL002	0,2500	0,3152 ± 0,0053	0,0252
CHL003	0,2500	0,3022 ± 0,0130	0,0242
CHL004	0,2500	0,3382 ± 0,0050	0,0271
CHL005	0,2500	0,3146 ± 0,0096	0,0252
CHL006	0,2500	0,3048 ± 0,0024	0,0244
CHL007	0,2500	0,3104 ± 0,0040	0,0248
CHL008	0,2500	0,3025 ± 0,0015	0,0242
CHL009	0,2500	0,3114 ± 0,0199	0,0249

Echantillon	Dosage déclaré (g)	Masse moyenne (g)	Masse pesée (g)
CFX001	0,2000	0,3427 ± 0,0194	0,0343
CFX002	0,2000	0,3974 ± 0,0089	0,0397
CFX003	0,2000	0,2756 ± 0,0132	0,0276
CFX004	0,2000	0,4603 ± 0,0043	0,0460
CFX005	0,2000	0,2789 ± 0,0266	0,0279
CFX006	0,2000	0,5099 ± 0,0118	0,0502
CFX007	0,2000	0,3245 ± 0,0070	0,0324
CFX008	0,2000	0,3758 ± 0,0050	0,0376
CFX009	0,2000	0,3106 ± 0,0095	0,0312
CFX010	0,2000	0,3579 ± 0,0058	0,0357
CFX011	0,2000	0,5061 ± 0,0259	0,0504
CFX012	0,2000	0,3325 ± 0,0070	0,0333
CFX013	0,2000	0,3025 ± 0,0070	0,0304
CFX014	0,2000	0,3175 ± 0,0059	0,0317
CFX015	0,2000	0,2145 ± 0,0105	0,0429
CFX016	0,2000	0,4365 ± 0,0029	0,0437
CFX017	0,2000	0,4987 ± 0,0075	0,0488
CFX018	0,2000	0,3326 ± 0,0039	0,0333
CFX019	0,2000	0,3116 ± 0,0145	0,0311
CFX020	0,2000	0,3465 ± 0,0149	0,0347
CFX021	0,2000	0,3769 ± 0,0100	0,0376
CFX022	0,2000	0,2453 ± 0,2273	0,0245

Tableau XVI. Prise d'essai par échantillon liquide en fonction de la teneur déclarée en céfixime

Echantillon	Dosage déclaré (mg/5mL)	Densité (g)	Masse pesée (g)
CFX023	100	1,1789	1,7890
CFX024	40	1,1228	2,8070
CFX025	100	1,1261	1,1261
CFX026	100	1,1281	1,1281
CFX027	50	1,1350	2,2700
CFX028	100	1,1445	1,1445
CFX029	40	1,1135	2,7835
CFX030	100	1,1041	1,1041
CFX031	100	1,1201	1,1201
CFX032	100	1,1398	1,1398
CFX033	200	1,1245	0,5622
CFX034	100	1,1431	1,1431
CFX035	100	1,0142	1,0142
CFX036	40	1,0563	2,6410

Tableau XVII. Prise d'essai par échantillon solide en fonction de la teneur déclarée en érythromycine et de la masse moyenne

Echantillon	Dosage déclaré (g)	Masse moyenne (g)	Masse pesée (g)
ERH003	0,5000	0,6512 ± 0,0002	0,0261
ERH004	0,0250	0,3171 ± 0,0004	0,0254
ERH005	0,5000	0,6213 ± 0,0024	0,0249
ERH006	0,0250	0,3094 ± 0,0002	0,0248
ERH007	0,5000	0,6415 ± 0,0001	0,0257
ERH008	0,0250	0,3254 ± 0,0003	0,0260
ERH009	0,0250	0,3014 ± 0,0002	0,0241
ERH010	0,5000	0,6369 ± 0,0003	0,0255
ERH011	0,0250	0,3142 ± 0,0003	0,0251

Tableau XVIII. Prise d'essai par échantillon liquide en fonction de la teneur déclarée en érythromycine

Echantillon	Dosage déclaré (mg/5mL)	Densité (g)	Masse pesée (g)
ERH001	250	1,1521	0,46084
ERH002	250	1,0698	0,42792
ERH012	125	1,1245	0,8996
ERH013	125	1,0589	0,84712
ERH014	250	1,1458	0,45832
ERH015	125	1,1145	0,8916
ERH016	125	1,2014	0,96112
ERH017	125	1,1781	0,94248

IV.4.5. Assurance qualité

L'ensemble des opérations et démarches effectuées dans ce travail a été réalisé dans le souci de garantir la fiabilité de nos résultats que ce soit au niveau :

- Des méthodes : nous avons veillé à ce que toute méthode d'analyse qui devrait être utilisée dans cette étude, soit tout d'abord validée selon les référentiels et/ou issues des pharmacopées. L'échantillonnage a été effectué selon les directives officielles et selon des instructions strictes telles que préconisées dans le point IV.3.1.2.
- Des appareils et verrerie : ils étaient préalablement qualifiés avant toute utilisation.
- Des laboratoires : les expérimentations ont été effectuées dans des laboratoires qui sont dotés des équipements appropriés de pointe et tenus par un personnel habilité et compétent.
- Des substances de référence, réactifs et solvants ont été obtenus des fournisseurs agréés avec la certification de leur qualité

- De la main-d'œuvre : nous avons préalablement suivi une formation en assurance qualité et contrôle qualité des médicaments et produits de santé dans un laboratoire qui dispose en son sein d'un Système-Qualité avec accréditation GMP (Good Manufacturing Practice) et pré-qualification OMS. Nous avons également suivi une formation sur "La norme ISO17025 version 2017 : comprendre ses exigences.

CHAPITRE V. PRESENTATION DES RESULTATS ET LEUR DISCUSSION

Dans ce chapitre nous présentons successivement les résultats de l'enquête en rapport avec l'utilisation des antibiotiques à Lubumbashi, de l'échantillonnage, de l'investigation de l'authenticité et de l'inspection visuelle des échantillons prélevés, de la revue systématique des méthodes HPLC et spectrophotométriques UV-visible utilisées dans ce travail, du développement des méthodes séparatives et non séparatives, de la validation des méthodes séparatives et non séparatives, de l'application (utilisation en routine) de ces méthodes sur des échantillons examinés ainsi que des tests physiques et pharmacotechniques.

V.1. ENQUETE SUR L'UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES

L'enquête a permis de sélectionner les antibiotiques les plus utilisés à Lubumbashi. Sur 1898 cas reçu, au moins un antibiotique a été prescrit dans 1164 cas dont 81,4 %, en monothérapie, 16,4 % en bithérapie et 2,2 % en trithérapie.

V.1.1. Répartition des antibiotiques les plus utilisés dans l'enquête

Les antibiotiques utilisés en monothérapie ont été majoritairement représentés par la famille des bêta-lactamines (49 %) suivie des quinolones (12 %), des nitrofuranes (8 %), des macrolides (9 %), de phénicolés (7 %) et de cyclines (6 %). Les autres familles ont présenté moins de 5 % des prescriptions (tableau XIX).

Il est établi que, dans la prise en charge des infections, la monothérapie peut suffire. Elle est à encourager par rapport à la bithérapie et/ou la trithérapie. En effet, les bithérapie/trithérapie présentent un certain nombre d'inconvénients notamment un coût élevé (CMIT, 2016). Cependant, les bithérapie/trithérapie peuvent être bénéfiques lorsqu'il faut rechercher une action synergique, une complémentarité de spectres et la prévention d'une émergence de résistance (CMIT, 2016). Au Ghana, 52 % des antibiotiques étaient utilisés en bithérapie, 36 % en monothérapie, 10,9 % en trithérapie et l'association de quatre antibiotiques représentait 0,6 % (Labi *et al.*, 2018).

Par ailleurs, la littérature rapporte que les bêta-lactamines sont parmi les antibiotiques les plus utilisés dans le traitement des infections. Leur sécurité et leur efficacité justifient leur large utilisation (Muller *et al.*, 2018 ; Fuchs *et al.*, 2017 ; Sticchi *et al.*, 2017). C'est ainsi que, Chlabicz *et al* (2014) ont montré qu'ils représentent 62 % des antibiotiques utilisés en Pologne tandis que Sticchi *et al* (2017) ont trouvé qu'ils représentaient 52 % des antibiotiques prescrits en Italie.

V.1.2. Répartition des antibiotiques utilisés selon les services

Dans notre étude, sur 279 cas pour lesquels la monothérapie a été instaurée en pédiatrie, les bêta-lactamines ont représenté 57 % du taux d'utilisation, suivis des macrolides (10 %), des phénicolés (9 %) et des aminosides (7 %). En revanche, en médecine interne, les bêta-lactamines ont présenté 45 % (303/669) du taux d'utilisation. Ils ont été suivis des quinolones avec 16 %, des nitrofuranes 10 %, des macrolides 8 % (53/669) et des phénicolés 6 % (39/669). Le taux d'utilisation des bêta-lactamines en pédiatrie a donc été supérieur par rapport à celui trouvé en médecine interne ($p < 0,05$; $OR = 1,62$). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en médecine interne les prescripteurs disposent de choix diversifié pour traiter des infections urinaires et digestives mais pas nécessairement en pédiatrie. Dans ce service, nous observons (i) quelques restrictions dans l'utilisation des fluoroquinolones et des cyclines (Choi *et al.*, 2013 ; Yee *et al.*, 2015 ; Kline *et al.*, 2012 ; Nydert *et al.*, 2011) (ii) l'indisponibilité des antibiotiques de formes pharmaceutiques adaptés aux enfants (Sosnik *et al.*, 2012 ; Nahata *et al.*, 1999). Ceci amène le prescripteur vers des molécules dont les formes pharmaceutiques sont disponibles. A cet égard, les bêta-lactamines présentent une diversité de formes galéniques adaptées à l'enfant pour traiter les infections urinaires et digestives.

V.1.3. Antibiothérapie instaurée suivant les infections

En monothérapie, l'amoxicilline a été la molécule la plus utilisée (100/948) (tableau XIX). Dans 47 % des cas, elle a été préconisée dans le traitement des infections respiratoires, 35 % dans le traitement des infections urinaires, 16 % dans des infections digestives et 2 % pour les infections néonatales. L'ampicilline (76/948), a été utilisée dans 34 % des cas pour traiter des infections digestives, 26 % pour le traitement d'infections urinaires et respectivement 25 % et 14 % pour le traitement d'infections respiratoires et de septicémies. Concernant la ciprofloxacine (76/948), elle a été utilisée pour traiter des infections digestives dans 68,4 % des cas, des infections urinaires (22,4 %) et respiratoires (9,2 %). Dans tous les cas où la nitrofurantoina (75/948) a été préconisée, il s'agissait d'infections urinaires. Le céfixime (70/948), a été utilisé dans 70 % des cas pour soigner des infections urinaires, respiratoires (17 %) et digestives (13 %). Le chloramphénicol (65/948), a été utilisé dans 45 % des cas pour traiter des infections digestives, des septicémies (34 %) et des infections du système nerveux central (21 %). Le céftriaxone (66/948) a été préconisé dans 45 % des cas pour traiter des infections urinaires, 38 % pour des infections respiratoires et 17 % pour traiter des septicémies. L'azithromycine (44/948) et l'érythromycine (38/948) ont été

exclusivement préconisées pour traiter des infections respiratoires alors que la tétracycline (45/948) a été uniquement utilisée pour des infections digestives. Le céfadroxyl (42/948) a été recommandé pour traiter des infections urinaires (64 %) et respiratoires (36 %). Les autres principes actifs, norfloxacin, combinaison amoxicilline+acide clavulanique, doxycycline, lévofloxacin, lincomycine, métronidazole et pénicilline V, amikacine, gentamicine et la combinaison en uni-dose de norfloxacin+métronidazole ont été indiqués pour traiter différentes pathologies infectieuses tel que le tableau (XIX) le montre. La forme galénique comprimé a représenté 39 % des cas, suivie de formes injectables 30 %, des gélules (24 %) et des Suspensions buvables (7 %).

Dans le cadre de l'utilisation des antibiotiques, Dekker *et al* (2017) ont aussi constaté que l'amoxicilline était l'antibiotique le plus préféré pour traiter plusieurs types d'infections aux Pays-Bas. Par contre, au Ghana, le métronidazole était l'antibiotique le plus utilisé (Labi *et al.*, 2018).

Tableau XIX. Caractéristiques des antibiotiques utilisés en monothérapie en fonction des maladies infectieuses diagnostiquées et des formes galéniques

Antibiotique	Péd n=279	Med int n=669	Total n=948	Pathologie infectieuse (effectif)	Forme gal (effectif)
Amikacine	0	5	5	infections urinaires(5)	inj (5)
Amoxicilline	36	64	100	infections urinaires(35); infections digestives(16); infections respiratoires(47); infections néonates(2)	gel (55); inj (45)
Amoxicilline+acide clavulanique	3	28	31	infections urinaires(19); infections respiratoires (12)	cp (28); sp (3)
Ampicilline	48	28	76	infections urinaires(20); septicémies(11); infections respiratoires(19), infections digestives(26)	inj (48); gel (28)
Azithromycine	17	27	44	infections respiratoires(44)	cp (34), sp (10)
Cefadroxyil	24	18	42	infections urinaires(27); infections respiratoires (15)	gel (25); sp (17)
Cefixime	34	36	70	infections urinaires (49); infections digestives(9), infections respiratoires(12)	cp (49); sp (21)
Céfotaxime	11	59	70	infections du SNC (10); infections respiratoires(24), (septicémies(14); infections urinaires(22)	inj (70)
Céftriaxone	4	62	66	infections urinaires(30); infections respiratoires (25); septicémies (11)	inj(66)
Céftriaxone+tazobactam		6	6	septicémies (6)	inj(6)
Chloramphénicol	26	39	65	infections du SNC(14); septicémie (22); infections digestives(29)	gel (58); inj (7)
Ciprofloxacine	0	76	76	infections digestives(52); infections urinaires(17), infections respiratoires(7)	cp (76)
Doxycycline	8	3	11	infections digestives(7); infections urinaires(4)	gel(11)
Erithromycine	12	26	38	infections pulmonaires(38)	cp (30); sp (8)
Gentamicine	19	16	35	infections urinaires(24); infections respiratoires(9), infections cutanées(2)	inj (35)
Lévofloxacine	0	6	6	infections sphère ORL(4); infections respiratoires(2)	cp (6)
Lincomycine	0	6	6	infections cutanées (6);	gel (6)
Metro inj	0	5	5	infections digestives(5)	inj (5)
Nitrofurantoïne	7	68	75	infections urinaires(75)	cp (75)
Norfloxacine	6	24	30	infections urinaires(13); infections digestives(17)	cp (30)
Norfloxacine+metronidazole	9	33	42	infections digestives(34); infections urinaires(8)	cp (38); sp(4)

Tableau XIX. Caractéristiques des antibiotiques utilisés en monothérapie en fonction des maladies infectieuses diagnostiquées et des formes galéniques

Antibiotique	Péd n=279	Med int n=669	Total n=948	Pathologie infectieuse (effectif)	Forme gal (effectif)
Pénicilline V	0	4	4	infections respiratoires(4)	cp (4)
Tétracycline	15	30	45	infections digestives(45)	gel (45)

Ped : pédiatrie ; med int: médecine interne ; gal : galénique ; cp : comprimé ; gel : gélule ; inj : injectable ; SNC : système nerveux central

Par ailleurs, la bithérapie a été très utilisée aussi bien en pédiatrie (144/191) qu'en médecine interne (47/191). Sur un total de 191 cas enregistrés en pédiatrie, 32 % ont concerné la combinaison de la famille bêta-lactamines+aminosides, bêta-lactamines+nitro-imidazolés (12 %), bêta-lactamines+bêta-lactamines (11,5 %), et respectivement 8,9 %, 6,8 % et 6 % pour quinolones+nitro-imidazolés, quinolones+cyclines et bêta-lactamines+phenicolés.

Dans l'antibiothérapie, l'association d'une bêta-lactamine et d'un aminoside présente l'avantage d'offrir une action synergique intéressante (Beganovic *et al.*, 2018 ; Baddour *et al.*, 2018). Ceci peut justifier le choix porté sur cette association ; en effet, l'action des bêta-lactamines sur la paroi bactérienne facilite la pénétration intracellulaire des aminosides (Beganovic *et al.*, 2018 ; Baddour *et al.*, 2018). Cependant, en vue de contourner les résistances observées, notamment vis-à-vis de *E. faecalis* dans le traitement des infections digestives sévères, la combinaison β lactames + β lactames présente une option intéressante dans le traitement des infections digestives sévères (Beganovic *et al.*, 2018). Dans cette association deux antibiotiques agissent de la même manière mais ne possèdent pas un spectre d'activité identique vis-à-vis des germes pathogènes. La complémentarité des spectres d'activité est en fait recherchée.

La trithérapie a été préconisée dans 25 cas. Tous ont concerné des infections néonatales. Par l'association de céfotaxime+ampicilline+gentamicine. Seule la forme injectable a été utilisée dans le service de pédiatrie. Pour des infections néonatales causées, entre autres, par les streptocoques du groupe B, *E. coli* et *Listeria monocytogenes*, il est envisageable de recourir à une trithérapie afin d'obtenir une action bactéricide rapide ayant une bonne diffusion méningée dans l'attente des résultats bactériologiques (Baddour *et al.*, 2018 ; Tziella *et al.*, 2015). L'association de trois antibiotiques à large spectre peut néanmoins provoquer une altération de la flore intestinale laissant place à l'émergence de souches pathogènes multi-résistantes, mais aussi une toxicité. Toutefois, Muller-Pebody *et al* (2017) ont rapporté dans leur étude aux Pays-bas que 94 % des infections néonatales étaient sensibles à l'association pénicilline et gentamycine, 100 % à l'association cefotaxime/amoxicilline, 98 % à l'association amoxicilline/pénicilline et 96 % au cefotaxime seul.

V.1.4. Antibiotiques utilisés selon les catégories d'âge

L'ampicilline a représenté 43 % (40/92) de tous les antibiotiques prescrits en pédiatrie pour les enfants âgés de 0-2 ans (tableau XX). Elle a été suivie de chloramphénicol avec 21 % (22/92) pour les jeunes enfants âgés de 12-15 ans.

Tableau XX. Nombre d'antibiotique prescrit en monothérapie selon la catégorie d'âge en pédiatrie

Antibactérien	0-2 ans n(%)	3-5 ans n(%)	6-11 ans n(%)	12-15 ans n (%)
Céfotaxime	9 (10)	1 (2)	1 (3)	0 (0)
Ceftriaxone+tazobactam	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Amoxicilline	4 (4)	8 (17)	10 (29)	14 (13)
Amoxicilline+acide clavulanique	2 (2)	1 (2)	0 (0)	0 (0)
Ampicilline	40 (43)	5 (11)	3 (9)	0 (0)
Doxycycline	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (8)
Azythromycine	9 (10)	3 (7)	2 (6)	3 (3)
Céfadroxyl	8 (9)	6 (13)	3 (9)	7 (7)
Céfixime	5 (5)	10 (22)	5 (14)	14 (13)
Ceftriaxone	4 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Chloramphénicol	0 (0)	0 (0)	4 (11)	22 (21)
Erythromycine	6 (7)	3 (7)	0 (0)	3 (3)
Gentamycine	3 (3)	5 (11)	7 (20)	4 (4)
Nitrofurantoin	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (7)
Norfloxacine	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (6)
norfloxacine+metronidazole	2 (2)	4 (9)	0(0)	3 (3)
Tétracycline	0 (0)	0 (0)	0 (0)	15 (14)
Total	92 (100)	46 (100)	35 (100)	106 (100)

En médecine interne, la ciprofloxacine a présenté 10 % de tous les antibiotiques prescrits pour les adultes âgés de 26-35 ans (tableau XXI). Ce constat se diffère de celui fait par Dekker *et al.*, (2017) au Pays-Bas qui ont montré que l'antibiotique le plus utilisé en pédiatrie chez les enfants de 0 à 2 ans était l'amoxicilline avec 72 %. Pour Shapiro *et al* (2013) aux Etats-Unis, l'amoxicilline est utilisée chez les adultes âgés de 26-35 ans avec une proportion de 41 %.

Tableau XXI. Nombre d'antibiotique prescrit en monothérapie selon la catégorie d'âge en médecine interne

Antibiotique prescrit	16-25 ans n(%)	26 -35 ans n(%)	36-45 ans n(%)	46-55 n(%)	≥ 56 ans n(%)
Cefotaxime	0(0)	11(5)	9(9)	8(8)	31(30)
Ceftriaxone+tazobactam	0(0)	2(1)	0(0)	0(0)	4(4)
Amoxicilline	19(14)	11(5)	8(8)	12(12)	14(13)
Amoxicilline+acide clavulanique	2(1)	19(8)	3(3)	0(0)	4(4)
Ampicilline	7(5)	14(6)	6(6)	1(1)	0(0)
Doxycycline	0(0)	3(1)	0(0)	0(0)	0(0)
Azythromycine	2(1)	8(4)	3(3)	0(0)	14(13)
Cefadroxyll	14(10)	0(0)	0(0)	4(4)	0(0)
Cefixime	19(14)	7(3)	1(1)	5(5)	4(4)
Ceftriaxone	9(6)	21(9)	7(7)	9(9)	16(15)
Chloramphenicole	14(10)	17(8)	3(3)	5(5)	0(0)
Erythromycine	5(4)	2(1)	4(4)	7(7)	8(8)
Gentamycine	0(0)	0(0)	10(10)	6(6)	0(0)
Nitrofurantoine	22(16)	18(8)	13(13)	11(11)	4(4)
Norfloxacine	0(0)	4(2)	6(6)	14(14)	0(0)
Norfloxacine+metronidazole	18(13)	3(1)	3(3)	4(4)	5(5)
Tetracycline	4(3)	14(6)	5(5)	7(7)	0(0)
Ciprofloxacine	3(2)	67(29)	3(3)	3(3)	0(0)
Levofloxacine	0(0)	0(0)	4(4)	2(2)	0(0)
Lincomycine	0(0)	5(2)	0(0)	1(1)	0(0)
Métronidazole	0(0)	0(0)	5(5)	0(0)	0(0)
Peni v	2(1)	0(0)	2(2)	0(0)	0(0)
Amikacine	0(0)	0(0)	2(2)	3(3)	0(0)
Total	140(100)	226(100)	97(100)	102(100)	104(100)

V.1.5. Pathologies infectieuses rencontrées

Concernant le profil des pathologies infectieuses, les infections urinaires ont été les plus représentées avec un taux de 35 %, suivies des infections respiratoires (31 %) et des infections digestives (21 %) alors que les autres pathologies n'ont pas dépassé 5 % comme l'illustre la figure 12.

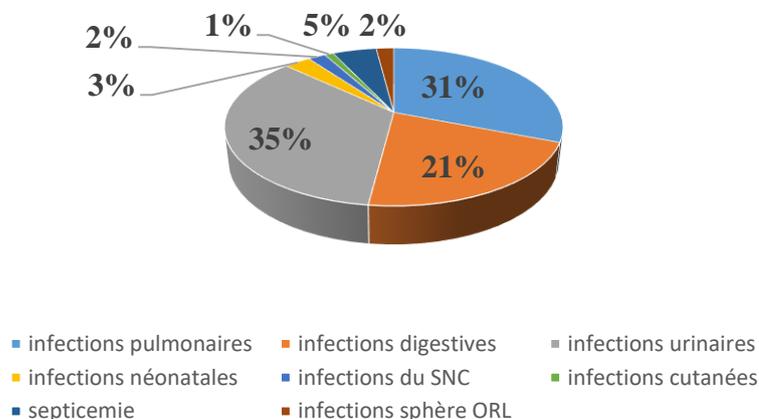


Figure 12. Répartition des cas selon pathologies infectieuses

Nous avons noté plus des cas en pédiatrie 448/628 (71,3 %) qu'en médecine interne 716/1270 (56,4 %) ($p < 0,05$) (tableau XIX). La prédominance du nombre des cas en pédiatrie serait logique, dans le sens où l'enfant ne dispose pas d'un système immunitaire bien développé par rapport à un adulte. A cet effet, l'enfant est plus prédisposé à contracter les infections que l'adulte. Une étude au Ghana, avait trouvé que les antibiotiques utilisés pour traiter des infections en pédiatrie présentaient la proportion (69,4 %) la plus élevée par rapport aux autres services (Labi *et al.*, 2018). Par contre, l'étude menée dans 226 hôpitaux de 41 pays du monde avait trouvé que le taux de prescription des antibiotiques en pédiatrie était de 36,7 % (Versporten *et al.*, 2016).

Les infections respiratoires ont été les plus rencontrées en pédiatrie (186/448) qu'en médecine interne (176/716) ($p < 0,05$) (tableau XX). Elles étaient suivies des infections urinaires (113/448) et digestives (70/448). Des études rapportent que des infections respiratoires sont les plus diagnostiquées en pédiatrie (Ceyhan *et al.*, 2010 ; Dekker *et al.*, 2017). Cependant, dans la majorité des cas, il n'est pas toujours indispensable d'instaurer une antibiothérapie pour traiter ces types d'infection. En effet, la plupart des infections respiratoires sont d'origine virale et ne nécessitent toujours pas une antibiothérapie (Ivanovski *et al.*, 2016).

Par ailleurs, en médecine interne, des infections urinaires ont été les plus représentées avec 40,6 % (291/716) des cas, suivies des infections respiratoires 24,6 % (176/716 cas) et digestives 23,7 % (170 cas). Ce constat est différent de celui fait par Shapiro *et al* (2013) aux Etats-Unis où des infections respiratoires étaient les plus représentées (41 %) par rapport aux infections urinaires (9 %) chez des adultes.

S'agissant du profil des patients, nous avons trouvé que 63 % des cas ont concerné le sexe féminin et 37 % le sexe masculin. L'âge moyen des patients consultés en médecine interne était de 32,8 ans, l'âge maximal (69 ans) et minimal (16 ans). En pédiatrie l'âge moyen était de 7,2 ans, 15 ans pour l'âge maximal et 3 jours pour l'âge minimal. Les patients provenaient de toutes les sept communes de la ville de Lubumbashi : 27% habitaient la commune annexe, 21% la commune de Lubumbashi, 17% pour Kampemba et respectivement 11, 10, 8 et 6% pour la commune de Katuba, Kamalondo, Ruashi et Kenya.

Ce travail nous a fourni des données essentielles quant à l'utilisation des antibiotiques et aux infections qui sévissent localement. Les résultats de cette enquête ont été indispensables pour nous permettre de sélectionner les antibiotiques sur lesquels mener l'étude relative à la falsification des antibiotiques.

Ainsi donc, à l'issue de cette enquête, nous avons retenu les 10 premiers antibiotiques qui ont été les plus utilisés : amoxicilline, ampicilline, céftriaxone, gentamicine, céfadroxyl, céfixime, chloramphénicol, tétracycline, azithromycine et érythromycine. Ensuite nous avons exclu de l'étude quatre antibiotiques :

- L'amoxicilline

Parce qu'elle fait l'objet de notre mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) ; Tshilombo *et al* (2018) l'ont analysé sur HPLC tandis que Mbinze *et al* (2015) ont aussi développé et validé une méthode spectrophotométrique UV-vis simple.

- L'ampicilline

Sous forme orale a été interdite en RD Congo à cause de sa faible biodisponibilité par voie orale (CNOP, 2018).

- Le céftriaxone et la gentamicine

Ils ont été également écartés de l'étude parce qu'elles ne se présentent que sous forme injectable.

C'est ainsi que six antibiotiques ont été retenus dans ce travail : azithromycine, céfixime, céfadroxil, érythromycine, chloramphénicol, tétracycline.

Dans le point ci-après nous présentons les résultats obtenus dans le cadre des activités de l'échantillonnage, l'investigation de l'authenticité et l'inspection visuelle des échantillons collectés.

V.2. ECHANTILLONNAGE, INVESTIGATION DE L'AUTHENTICITE ET INSPECTION VISUELLE DES ECHANTILLONS COLLECTES

Nous avons collecté 121 échantillons dont 85 dans les circuits formels de distribution des médicaments et 36 dans les circuits informels (voir l'organigramme ci-dessous). Les observations préliminaires effectuées sur ces 121 échantillons par rapport aux critères (voir section IV.3.1.3.) d'inclusions fixés dans le travail ont permis de retirer 19 échantillons de l'étude.

Tableau XXII. Informations relatives aux échantillons collectés

ECH	DCI	Forme et dosage	Pays de prov.	date de fab	date d'exp.	N° de lot	lieu de collecte	Prix (USD)	N°AMM	Conclusion
AZT001	Azythromycine	comprimé 500mg	Inde	déc-16	mai-19	2026	CFDM	1,25	MS.1253/10/05/DGM/0339/2015	Conforme
AZT002	Azythromycine	poudre pr Susp buv 200mg/5ml	Inde	août-17	juil-19	AZE-04	CFDM	2,38	le produit oui mais fabricant non	Non conforme
AZT003	Azythromycine	poudre pr Susp buv 200mg/5ml	Italie	sept-17	sept-19	720401	CFDM	11,25	Manque d'info	Non conforme
AZT004	Azythromycine	comprimé 500mg	Maroc		sept-19	1244784	CFDM	11,88	MS1253/10/05/080/2011	Conforme
AZT005	Azythromycine	comprimé 250mg	Tanzanie	janv-17	déc-15	170001	CFDM	3,13	MS.1253/10/05/DGM/0312/2013	Conforme
AZT006	Azythromycine	comprimé 250mg	USA		sept-19	N50900	CFDM	2,25	MS1253/10/05/080/2011	Conforme
AZT007	Azythromycine	comprimé 500mg	Inde	nov-17	oct-20	T42002	CIDM	0,83	MS.1253/10/05/DGM/0486/2016	Conforme
AZT008	Azythromycine	Susp 100mg/5mL	RDC	oct-17	sept-20	1531017	CIDM	1,32	MS 1253/10/01/0255/2011	Conforme
AZT009	Azythromycine	comprimé 500mg	RDC	sept-17	août-20	C02409	CFDM	1,18	MS 1253/10/01/0254/2011	Conforme
AZT010	Azythromycine	comprimé 500mg	Inde	mars-16	févr-19	333P603 X	CFDM	1,90	Manque d'info	Conforme
AZT011	Azythromycine	comprimé 200mg	Inde	août-17	juil-19	AZE-04	CFDM	2,38	le produit oui mais fabricant n	Non conforme

ECH	DCI	Forme et dosage	Pays de prov.	date de fab	date d'exp.	N° de lot	lieu de collecte	Prix (USD)	N°AMM	Conclusion
AZT012	Azythromycine	Susp 250mg/5ml	Tanzanie	janv-17	déc-18	149112	CFDM	3,13	MS.1253/10/05/DGM/0313/2013	Conforme
AZT013	Azythromycine	comprimé 500mg	RDC	sept-16	sept-19	161814	CIDM	3,38	MS 1253/10/01/0254/2011	Conforme
AZT014	Azythromycine	comprimé 500mg	Inde	août-16	juil-19	422P603 X	CIDM	1,90	Manque d'info	Conforme
AZT015	Azythromycine	Susp 100mg/5mL	RDC	juil-16	août-19	1491013	CFDM	3,38	MS 1253/10/01/0255/2011	Conforme
CFD001	Cefadroxyl	comprimé 500mg	France	févr-17	janv-20	7C05056	CFDM	3,44	MS.1253/10/05/DGM/0261/2013	Conforme
CFD002	Cefadroxyl	poudre pr Susp buv 250mg/5mL	France	sept-16	août-19	6J04081	CFDM	8,25	MS.1253/10/05/DGM/0259/2013	Conforme
CFD003	Cefadroxyl	poudre pr Susp buv 250mg/5mL	Inde	juil-16	juin-19	1036	CFDM	2,19	Manque d'info	Non conforme
CFD004	Cefadroxyl	gélule 500mg	Inde	mai-16	avr-19	SL601	CIDM	3,09	Manque d'info	Non conforme
CFD005	Cefadroxyl	gélule 500mg	Inde	août-16	juil-19	1036	CIDM	2,02	Manque d'info	Non conforme
CFD006	Cefadroxyl	gélule 500mg	Inde	janv-14	févr-19	851	CIDM	1,34	Manque d'info	Non conforme
CFD007	Cefadroxyl	gélule 500mg	Inde	juin-16	mai-19	1,04E+08	CFDM	2,28	MS.1253/10/01/0317/2013	Conforme
CFD008	Cefadroxyl	gélule 500mg	Inde	sept-17	juin-19	CB7231	CFDM	2,82	MS.1253/10/05/DGM/0034/2013	Conforme

ECH	DCI	Forme et dosage	Pays de prov.	date de fab	date d'exp.	N° de lot	lieu de collecte	Prix (USD)	N°AMM	Conclusion
CFD009	Cefadroxyl	gélule 500mg	Inde	mai-17	avr-19	DE5131	CFDM	2,62	MS1253/10/05/0205/2011	Conforme
CFD010	Cefadroxyl	gélule 500mg	Inde	avr-17	mars-20	1,15E+08	CFDM	2,79	MS.1253/10/01/0246/2013	Conforme
CFD011	Céfadroxyl	poudre pr Susp buv 250mg/5mL	Inde	oct-16	sept-18	CB4632	CFDM	2,81	MS.1253/10/05/0205/2011	Non conforme
CFD012	Cefadroxyl	comprimé 500mg	France	avr-16	mars-19	6A05056	CFDM	3,61	MS.1253/10/05/DGM/00261/2013	Conforme
CFD013	Cefadroxyl	Susp 250/5mL	Inde	mars-16	févr-19	CB421	CFDM	1,63	Manque d'info	Non conforme
CFD014	Cefadroxyl	Gélule 500mg	France	juin-17	mai-20	6E10084	CIDM	6,05	MS.1253/10/05/DGM/00258/2013	Conforme
CFD015	Cefadroxyl	gélule 500mg	Inde	nov-16	oct-19	10315	CFDM	2,33	Manque d'info	Non conforme
CFD016	Cefadroxyl	gélule 500mg	Inde	avr-16	mars-19	7227002	CIDM	2,19	Manque d'info	Non conforme
CFD017	Cefadroxyl	gélule 500mg	Inde	juin-17	mai-20	12102	CIDM	1,68	Manque d'info	Non conforme
CHL001	Chloramphenicol	gélule 250mg	Inde	juin-15	mai-19	7351299	CIDM	0,19	Manque d'info	Non conforme
CHL002	Chloramphenicol	gélule 250mg	Inde	août-17	juil-20	CF-17	CFDM	0,33	MH/DRUG/KD-440	Conforme
CHL003	Chloramphenicol	gélule 250mg	Chine	juin-17	mai-20	S12	CFDM	0,12	Manque d'info	Non conforme
CHL004	Chloramphenicol	gélule 250mg	Chine	août-17	août-19	w170827	CFDM	0,13	MS1253/10/050132/2011	Conforme

ECH	DCI	Forme et dosage	Pays de prov.	date de fab	date d'exp.	N° de lot	lieu de collecte	Prix (USD)	N°AMM	Conclusion
CHL005	Chloramp henicole	gélule 250mg	Chine	févr-17	mars-19	z154289	CIDM	0,13	MS1253/10/05/0132/2011	Conforme
CHL006	Chloramp henicole	gélule 250mg	Inde	janv-17	févr-19	CF-15	CFDM	0,33	MH/DRUG/KD-440	Non conforme
CHL007	Chloramp henicole	gélule 250mg	Chine	juin-19	nov-19	S10	CIDM	0,13	Manque d'info	Non conforme
CHL008	Chloramp henicole	gélule 250mg	Chine	déc-16	nov-19	L601411 M	CIDM	0,13	MS.1253/10/05/DGM/0121/2015	Non conforme
CHL009	Chloramp henicole	gélule 250mg	Inde	janv-17	déc-20	CF-12	CFDM	0,33	MH/DRUG/KD-440	Non conforme
ERH001	Erythromycine	poudre pr Susp buv 250mg/5mL	RDC	janv-18	déc-20	DGO10118	CIDM	0,94	Manque d'info	Non conforme
ERH002	Erythromycine	poudre pr Susp buv 250mg/mL	RDC	juil-17	juil-19	B1075-CV	CFDM	0,94	Manque d'info	Non conforme
ERH003	Erythromycine	comprimé 500mg	Inde	nov-17	oct-20	Y7012	CFDM	0,13	MH/101358 A	Conforme
ERH004	Erythromycine	comprimé 250mg	Inde	sept-17	août-20	Y7006	CFDM	0,13	MH/101358 A	Conforme
ERH005	Erythromycine	comprimé 500mg	Inde	juin-17	mai-20	DR-29	CIDM	0,43	MH/DRUG S/KD-440	Non conforme
ERH006	Erythromycine	comprimé 250mg	Inde	juil-16	juin-19	DE-15	CFDM	0,30	MH/DRUG S/KD-440	Non conforme
ERH007	Erythromycine	comprimé 500mg	Inde	mars-17	févr-19	B104	CFDM	0,28	MS1253/10/01/0114	Conforme
ERH012	Erythromycine	poudre pr Susp buv	RDC	nov-17	oct-19	46k17	CFDM	0,30	MS1253/10/05/DGM/0236	Non conforme
ERH013	Erythromycine	poudre pr Susp buv	RDC	sept-17	août-19	34/17	CFDM	0,45	MS1253/10/05/DGM/0236	Non conforme

ECH	DCI	Forme et dosage	Pays de prov.	date de fab	date d'exp.	N° de lot	lieu de collecte	Prix (USD)	N°AMM	Conclusion
ERH008	Erythromycine	comprimé 250mg	Inde	août-16	juil-19	P5135	CFDM	0,13	MH/101358 A	Conforme
ERH014	Erythromycine	poudre pr Susp buv250mg/mL	RDC	nov-16	oct-18	A0243-CV	CIDM	0,94	Manque d'info	Non conforme
ERH015	Erythromycine	poudre pr Susp buv	RDC	nov-16	sept-18	34L11	CFDM	0,30	MS1253/10/05/DGM/0236	Non conforme
ERH009	Erythromycine	comprimé 250mg	Inde	févr-17	janv-20	b00325	CFDM	0,13	MH/101358 A	Conforme
ERH010	Erythromycine	comprimé 500mg	Inde	juin-17	mai-20	B104	CFDM	0,28	MS1253/10/01/0114	Conforme
ERH011	Erythromycine	comprimé 250mg	RDC	mai-17	avr-19	BCO30143	CFDM	0,94	Manque d'info	Non conforme
ERH016	Erythromycine	poudre pr Susp buv	RDC	juil-16	mai-18	41/16	CIDM	0,45	MS1253/10/01/0114	Non conforme
ERH017	Erythromycine	poudre pr Susp buv	RDC	sept-17	août-19	33/17	CFDM	0,45	MS1253/10/01/0114	Non conforme
TRC001	Tetracycline	gélule 250mg	Inde	sept-17	août-20	TR-24	CFDM	0,17	MH/DRUG/KD-440	Non conforme
TRC002	Tetracycline	gélule 250mg	Chine		juil-20	17085	CIDM	0,31	Manque d'info	Non conforme
TRC003	Tetracycline	gélule 250mg	Chine	juil-17	juil-20	170766	CFDM	0,16	Manque d'info	Non conforme
TRC004	Tetracycline	gélule 500mg	Chine	août-17	août-20	w170809	CFDM	0,08	Manque d'info	Non conforme
TRC005	Tetracycline	gélule 250mg	Chine	avr-16	mars-18	142005	CFDM	0,16	Manque d'info	Non conforme
TRC006	Tetracycline	gélule 250mg	Chine	août-16	août-19	D02458	CFDM	0,08	Manque d'info	Non conforme
TRC007	Tetracycline	gélule 250mg	Chine		avr-19	140256	CIDM	0,31	Manque d'info	Non conforme

ECH	DCI	Forme et dosage	Pays de prov.	date de fab	date d'exp.	N° de lot	lieu de collecte	Prix (USD)	N°AMM	Conclusion
TRC008	Tetracycline	gélule 250mg	Inde	juin-16	mai-19	TR-11	CFDM	0,17	MH/DRUG/ KD-440	Conforme
CFX001	Cefixime	comprimé 200mg	Inde	oct-17	sept-19	CFC7002	CIDM	2,19	MS1253/10/ 01/0014	Conforme
CFX002	Cefixime	comprimé 200mg	Inde	oct-17	sept-19	TCF0701 8	CIDM	1,44	MS1253/10/ 01/0082	Non conforme
CFX003	Cefixime	poudre pr Susp buv 100mg/5mL	Bangladesh	sept-16	août-19	509001	CFDM	2,19	le produit oui mais fabricant non	Non conforme
CFX004	Cefixime	comprimé 100mg	Inde	févr-17	juil-19	7006	CFDM	2,19	Manque d'info	Non conforme
CFX005	Cefixime	comprimé 200mg	Inde	août-16	juil-19	ELEAF16 005	CFDM	6,06	MS1253/10/ 01/0081	Conforme
CFX006	Cefixime	poudre pr Susp buv 40mg/5mL	RDC	juil-17	juin-19	MDN 10	CIDM	4,00	Manque d'info	Non conforme
CFX007	Cefixime	poudre pr Susp 100mg/5mL	France	oct-17	sept-19	293	CFDM	20,00	MS 1253/10/05/ DGM/0138	Conforme
CFX008	Cefixime	comprimé 200mg	France	mai-17	avr-19	61	CFDM	17,50	MS 1253/10/05/ DGM/0139	Conforme
CFX009	Cefixime	poudre pr Susp buv 100mg/5mL	Inde	févr-17	janv-19	7005	CIDM	2,19	Manque d'info	Non conforme
CFX010	Cefixime	poudre pr Susp buv 50mg/5mL	Inde	juin-17	mai-19	ELEAD1 7007	CFDM	2,13	MS1253/10/ 05/0302	Conforme
CFX011	Cefixime	poudre pr Susp buv 100mg/5mL	Inde	nov-16	oct-19	AEBLO2 001	CFDM	4,06	Manque d'info	Non conforme
CFX012	Cefixime	comprimé 200mg	Inde	nov-16	oct-19	AEBLO1 001	CIDM	5,63	Manque d'info	Non conforme

ECH	DCI	Forme et dosage	Pays de prov.	date de fab	date d'exp.	N° de lot	lieu de collecte	Prix (USD)	N°AMM	Conclusion
CFX013	Cefixime	poudre pr Susp buv 40mg/5mL	France	juil-17	juin-19	144	CFDM	9,38	MS 1253/10/05/ DGM/0138	Conforme
CFX014	Cefixime	poudre pr Susp 100mg/5mL	Inde	nov-16	oct-18	AEBLO2 001	CFDM	2,13	Manque d'info	Non conforme
CFX015	Cefixime	poudre pr Susp buv	RDC	août-17	juil-19	CM7007	CIDM	6,07	Manque d'info	Non conforme
CFX016	Cefixime	gélule 200mg	RDC	avr-17	mars-19	MD10	CFDM	4,06	Manque d'info	Non conforme
CFX017	Cefixime	comprimé 200mg	Inde	juin-17	mai-19	80024	CFDM	2,00	MP/DRUG S/28/14/95	Non conforme
CFX018	Cefixime	comprimé 200mg	Inde	avr-17	mars-19	OBT1700 58A	CFDM	1,57	Manque d'info	Non conforme
CFX019	Cefixime	comprimé 200mg	Inde	juil-17	juin-19	TE7231	CFDM	2,82	Manque d'info	Non conforme
CFX020	Cefixime	poudre pr Susp buv 100mg/5mL	Inde	août-17	17/2019	CM7009	CFDM	2,13	MS1253/10/ 05/DGM/03 93	Conforme
CFX021	Cefixime	comprimé 200mg	Inde	nov-16	oct-18	AEBLO1 001	CFDM	2,19	Manque d'info	Non conforme
CFX022	Cefixime	comprimé 200mg	Inde	août-17	juil-19	TCF0C80 03	CFDM	5,07	Manque d'info	Non conforme
CFX023	Cefixime	comprimé 200mg	Inde	nov-16	oct-18	71025	CFDM	3,44	MP/DRUG S/28/14/95	Non conforme
CFX024	Cefixime	comprimé 200mg	Inde	juin-17	mai-20	CA145	CFDM	1,95	Manque d'info	Non conforme
CFX025	Cefixime	comprimé 100mg	Inde	avr-17	mars-20	DE012	CFDM	0,28	Manque d'info	Non conforme
CFX026	Cefixime	Susp 200mg/5mL	Inde	juil-17	juin-19	FE012	CIDM	2,28	Manque d'info	Non conforme
CFX027	Cefixime	Susp 100mg/5mL	Inde	juil-17	juin-19	CE501	CFDM	2,82	Manque d'info	Non conforme

ECH	DCI	Forme et dosage	Pays de prov.	date de fab	date d'exp.	N° de lot	lieu de collecte	Prix (USD)	N°AMM	Conclusion
CFX028	Cefixime	Comprimé 200mg	France	oct-17	sept-19	293	CFDM	20,00	MS 1253/10/05/ DGM/0138	Conforme
CFX029	Cefixime	comprimé 200mg	Inde	juin-17	mai-20	ELEAF17 201	CFDM	4,06	MS1253/10/ 05/0302	Conforme
CFX030	Cefixime	comprimé 200mg	Inde	juil-17	juin-20	ACATO3 104	CFDM	5,63	Manque d'info	Non conforme
CFX031	Cefixime	Susp 5mg/mL	Inde	mars-17	févr-20	ABDET2 804	CFDM	5,63	Manque d'info	Non conforme
CFX032		comprimé 200mg	Inde	déc-16	nov-18	DBC4108	CFDM	2,19	MS1253/10/ 01/0014	Conforme
CFX033		gélule 200mg	RDC	oct-16	mars-19	MD01	CFDM	4,06	Manque d'info	Non conforme
CFX034	Cefixime	comprimé 200mg	Inde	janv-17	déc-18	CG7010	CIDM	2,82	Manque d'info	Non conforme
CFX035	Cefixime	poudre pr Susp buv 40mg/5mL	France	oct-16	sept-18	136	CFDM	9,38	MS 1253/10/05/ DGM/0138	Conforme
CFX036	Cefixime	comprimé 200mg	Inde	juil-16	juin-18	POP6900 4	CFDM	1,44	MS1253/10/ 01/0082	Conforme

Légende: ECH: Echantillon; DCI: Dénomination Commune Internationale; CFDM : Circuit Formel de Distribution des Médicaments ; CIDM : Circuit Informel de Distribution des Médicaments.

Onze échantillons dont cinq de l'azithromycine, quatre de céfadroxil et deux de céfixime ont été retirés à cause du dépassement de la date d'expiration indiquée sur l'emballage avant les opérations d'analyse aux laboratoires, cinq échantillons (deux de la tétracycline, deux du céfadroxil et un de céfixime) ont été exclus après avoir examiné l'intégrité de la forme galénique, et trois échantillons de l'azithromycine n'ont pas présenté un nombre d'unités suffisant nécessaire pour être analysés. Seulement 102 (tableau XXII) échantillons ont été analysés en Belgique à Liège, Mons et Lubumbashi.

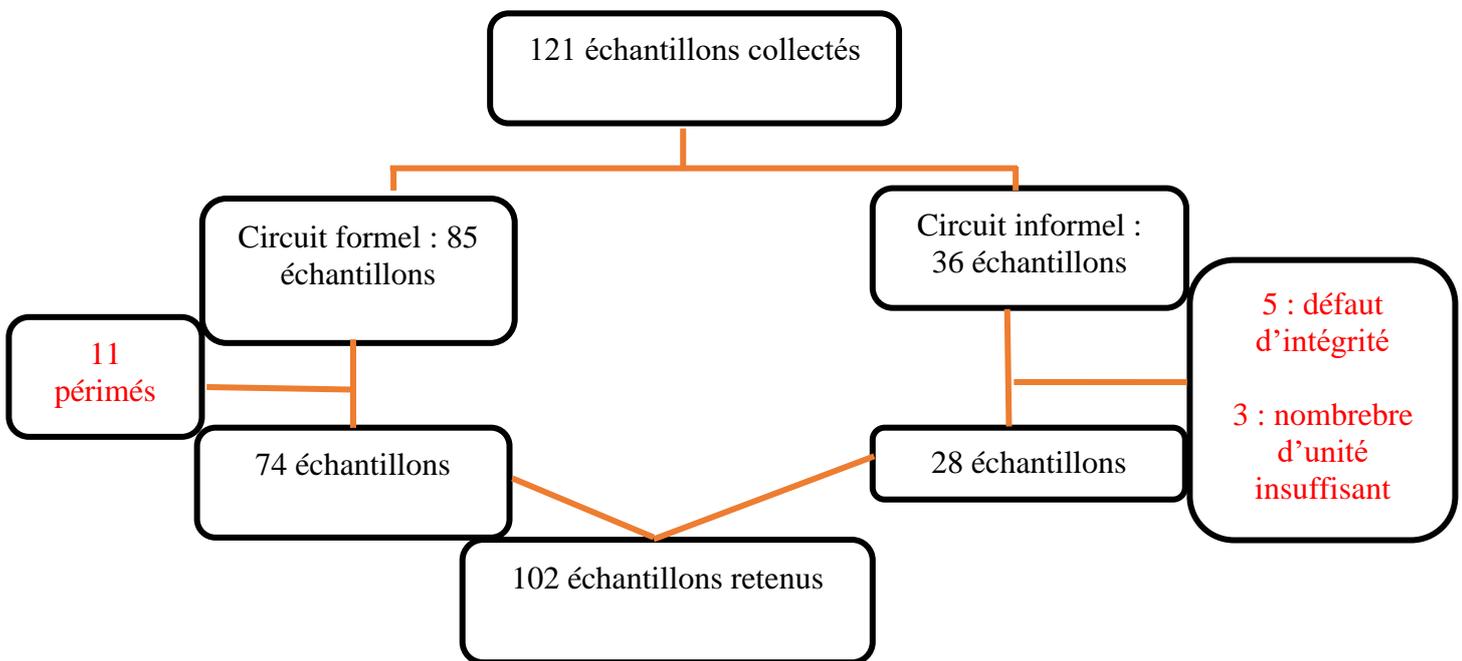


Figure 13. Organigramme de la sélection des échantillons étudiés

V.2.1. Echantillons collectés selon les pays de fabrication et lieux de collecte

Cinquante-huit pour cent (58 %) des échantillons collectés ont été fabriqués en Inde, 17 % en RD Congo, 11 % en Chine et 9 % en France. Les autres pays de provenance des échantillons n'ont pas présenté plus de 3 % tel qu'illustré sur la figure 14. Cette constatation corrobore des études antérieures rapportant que l'Inde est parmi le plus grand fournisseur des médicaments qui circulent en Afrique (Shah *et al.*, 2015).

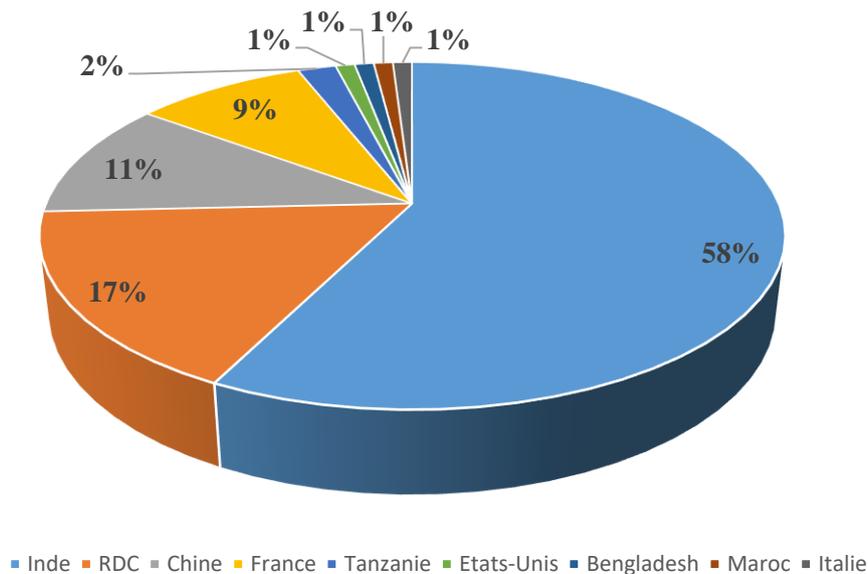


Figure 14. Répartition des échantillons collectés selon les pays de provenance

Plusieurs études ont trouvé que les dépôts pharmaceutiques sont les lieux de collecte les plus représentés en termes de nombre d'échantillons (Kalonji, 2012 ; Mwamba *et al.*, 2016 ; Tshilombo *et al.*, 2018). Ces points de vente des médicaments approvisionnent en effet l'ensemble des établissements pharmaceutiques, que ce soit en milieu urbain ou périurbain. Un constat similaire a été établi dans ce travail. En effet, sur un total de 102 échantillons considérés dans l'étude, 73 % des échantillons ont été collectés dans les circuits formels de distribution des médicaments et 27 % dans les circuits informels.

Etant donné que les circuits formels, représentés dans ce travail par les dépôts pharmaceutiques, approvisionnent tous les points de vente des médicaments, il est indéniable que les lots des médicaments collectés dans les EVG soient les mêmes que ceux retrouvés dans les autres points de vente, y compris dans les circuits informels, représentés dans cette étude par les marchés de vente de médicaments. Trois possibilités peuvent expliquer ce phénomène de diversité de lot

des échantillons (i) le lot de médicaments a déjà été vendu par les grossistes traîne encore dans d'autres structures alors que l'EVG a déjà reçu un nouveau lot ; (ii) le lot collecté dans le circuit informel est entré par contrebande et n'a donc pas suivi le circuit normal de distribution des médicaments (iii) le lot fourni par les grossistes étant périmé, il est alors falsifié au niveau de la date de péremption par les falsificateurs.

L'adresse complète du fabricant est un élément que celui-ci est appelé à fournir sur l'emballage de son produit (OMS, 2010 ; Robin, 2013). Elle doit permettre de le contacter en cas de besoin afin d'apporter des informations supplémentaires sur son produit (Newton *et al.*, 2015). Dans ce travail, 17 % d'échantillons ne portaient pas l'adresse du fabricant. Cette situation est inquiétante car ceci constitue l'une des caractéristiques d'un médicament falsifié.

V.2.2. Répartition des échantillons selon les principes actifs

L'analyse des données présentées dans le tableau XXII permet de souligner que, sur un total de 102 échantillons considérés, le céfixime a été le plus représenté (35 %), suivi du céfadroxil (17 %), de l'érythromycine (17 %), de l'azithromycine (15 %), du chloramphénicol (9 %) et de la tétracycline (8 %). La prédominance des échantillons de céfixime par rapport aux autres antibiotiques vient de ce que le céfixime a été la substance active pour laquelle nous avons noté un nombre supérieur, soit 11 fabricants par rapport aux autres substances actives qui ont enregistré 8 fabricants pour azithromycine, 7 pour céfadroxil, 6 pour érythromycine et 5 pour tétracycline et chloramphénicol. Il y a donc plus de probabilité de trouver des échantillons de différents lots, s'il existe plusieurs fabricants pour une même molécule médicamenteuse. En outre, le céfixime est l'une de céphalosporines de troisième génération de plus en plus utilisée par voie orale pour traiter plusieurs types d'infections (Ibrahim *et al.*, 2018). Ceci inciterait les fabricants à le produire davantage.

Dans l'ensemble, les comprimés ont présenté 41 % des échantillons, suivis de suspensions buvables (30 %) et de gélules (29 %). La prédominance du nombre d'échantillon en comprimés peut s'expliquer par le fait que les comprimés sont les formes galéniques les plus utilisées car elles présentent un certain nombre d'avantages : fabrication industrielle aisée, dosage en principe actif précis, emploi facile et conservation excellente.

V.2.3. Prix d'acquisition des échantillons

Les prix des échantillons collectés sont rarement abordés dans des études de contrôle qualité des médicaments. Néanmoins, En Ethiopie, Belew *et al* (2018) ont pris en compte le prix des échantillons collectés. Dans notre étude, le prix des échantillons varie selon la molécule active. La tétracycline a été l'antibiotique le moins coûteux, une fourchette de prix (0,08 USD et 0,31 USD). Par contre, le céfixime a été l'antibiotique le plus coûteux avec 1,44 et 20,00 USD (tableau XXII).

Il convient de souligner que, pour l'azithromycine, le céfadroxyl et le céfixime, une importante dispersion des prix a été constatée pour un même principe actif. En effet, les produits d'origine européenne ou américaine avaient un prix largement supérieur par rapport à ceux provenant de l'Inde, de la Chine ou produits localement. Dans ce contexte, il est difficile pour la population locale qui, généralement, vit sous le seuil de la pauvreté, de se procurer des médicaments provenant de l'Europe ou des Etats-Unis. Les médicaments fabriqués en Inde et en Chine sont donc les plus utilisés par la population locale.

En se basant sur cet aspect, les fabricants indiens ou chinois cibleraient les produits fabriqués en Europe en y apportant des légères modifications soit au niveau du nom de marque ou encore de la présentation de l'emballage et du produit pour essayer de faire croire à la population que le céfixime fabriqué en Europe qui coûte par exemple 20 USD, peut-être obtenu à 4 USD. Malheureusement, Cette situation est aussi souvent exploitée par les falsificateurs qui copient illicitement les produits coûteux et les fixent à des prix dérisoires afin de les écouler rapidement.

V.2.4. Investigation de l'authenticité auprès de l'ARP et fabricant

Il a été rapporté que la surveillance des médicaments par l'enregistrement et l'autorisation de mise sur le marché (AMM) est un des facteurs permettant la diminution du taux de médicaments de qualité inférieure dans un pays donné (El-Jardali *et al.*, 2015). Dans le contexte de cette étude, 43 % (44/102) des échantillons collectés n'ont pas été enregistrés et autorisés à être commercialisés en RD Congo. La tétracycline a présenté 75 % (6/8) des cas, suivie du céfixime 55 % (20/36), du céfadroxil 47 % (8/17), de l'érythromycine 24 % (4/17), du chloramphénicol 33 % (3/9) et de l'azithromycine 20 % (3/15).

Sur le total de 44 échantillons n'ayant pas d'AMM, l'Inde a présenté 61 % des cas, suivie de la Chine (18%), des produits fabriqués localement (18 %) et de l'Italie (2 %). La proportion des échantillons n'ayant pas d'AMM collectés dans le circuit informel de distribution, a été

supérieure (64,3 % vs 35,1% ; $p < 0.05$) par rapport au circuit formel de distribution. Trois échantillons dont deux d'azithromycine et un de céfixime ont été bien enregistrés au pays mais ne correspondaient pas aux noms de fabricant tels que repris dans le répertoire officiel des médicaments enregistrés et autorisés à être commercialisés en RD Congo.

Considérant que l'AMM est le garant de la qualité des médicaments, il est vraisemblable que la proportion élevée de médicaments n'ayant pas d'AMM en RD Congo soit en partie responsable des cas de médicaments falsifiés et de qualité inférieure rapportés dans ce pays (Mwamba *et al.*, 2016 ; Peyraud *et al.*, 2017 ; Mufusama *et al.*, 2018).

Par ailleurs, nous avons tenté d'entrer en contact avec les fabricants pour lesquels les échantillons ne disposaient pas de numéro d'autorisation de mise sur le marché ou pour lesquels des doutes ont été émis quant à la présentation des emballages primaires et secondaires.

Les fabricants ont été contactés en leur envoyant un message soit à partir de leur site internet, soit à partir de leur adresse e-mail disponible sur ce site. La liste des adresses et coordonnées de contact des fabricants est reprise dans l'annexe V (page vi). Notre correspondance a demandé au fabricant de formellement attester que les informations présentes sur l'emballage de son produit étaient exactes. En plus, nous leur joignons une photo haute résolution de l'échantillon concerné. L'annexe IV (page v) reprend le modèle de la lettre envoyée aux différents fabricants. A cet effet, 21/38 fabricants soit 55 % ont été ciblés ; sur ces 21, 19 % ont été contactés à partir du site du fabricant, 19 % autres n'avaient pas des coordonnées de contact c'est à dire pas d'adresse e-mail et ni de site à partir duquel ils pouvaient être contacté, un autre fabricant n'avait pas pu être contacté à cause d'une adresse e-mail erronée tirée de son site.

De ce fait, 12 fabricants ont été contactés. De ces 12, six ont répondu à la requête. Un fabricant a reconnu que son produit a été falsifié au niveau de la durée de validité du produit et un autre a admis qu'il y avait une erreur de la présentation de son emballage sans fournir d'autres précisions par rapport aux inquiétudes posées sur le produit. Quatre fabricants ont attesté que les informations reprises sur l'emballage étaient exactes et que le produit provenait bien de l'entreprise. Dans son étude en Côte d'Ivoire, sur 52 fabricants contactés, Legris (2005) a pu obtenir la réponse des 35 soit 67 %. Khan *et al* (2013) avaient aussi investigué l'authenticité des médicaments auprès de l'autorité de réglementation pharmaceutique des pays de fabrication et auprès des fabricants. Sur 11 ARP contactés dans son étude, seulement 3 avaient réagi à la demande.

V.2.5. Inspection visuelle

L'inspection visuelle attentive des échantillons ont permis de déceler quelques irrégularités au niveau de la présentation des emballages primaires ou secondaires et/ou au niveau de l'aspect de la forme galénique. Nous pouvons évoquer le cas de deux échantillons (CFD003 et CFD004) à base de céfadroxil, commercialisé sous le nom de Theradox[®] et produits par deux fabricants : *Zim Laboratories* et *Sapphire Lifesciences*. Les deux échantillons prêtaient confusion pour être distingués l'un par rapport à l'autre comme illustré dans la figure 15. Les différences apparaissaient au niveau de format du numéro de lot, de la couleur des gélules et du font de couleur présent sur l'emballage.



Figure 15. Illustrations des irrégularités observées sur l'emballage des échantillons de céfadroxil

Le fait que deux médicaments produits par deux fabricants différents soient commercialisés sous un même nom de marque peut constituer un acte à décourager dans la lutte contre la

falsification des médicaments. En effet, le nom de marque permet de distinguer les produits similaires des concurrents et est unique pour une même entreprise (Robin, 2013).

Des investigations sur les deux produits ont été menées auprès de deux fabricants. Le laboratoire *Zim Laboratories* a été contacté par mail (prélevé à partir de son site) et le laboratoire *Sapphire Lifesciences*, à partir de son site car son adresse e-mail n'a pas été retrouvée dans le site. La réaction de *Zim Laboratories* a été obtenue alors que celle de *Sapphire Lifesciences* ne l'a pas été, malgré plusieurs rappels effectués en rapport avec la requête qui lui a été adressée. Le laboratoire *Zim Laboratories* a affirmé que le numéro de lot, la couleur de gélule, l'adresse, le numéro de licence, l'emballage et le code barre appartenaient bel et bien à son laboratoire. Cependant, la date de péremption telle que mentionnée sur l'emballage n'était pas exacte. En d'autres mots, la date de péremption de son produit a été falsifiée. Concernant l'autre Theradox[®] produit par *Sapphire Lifesciences*, le laboratoire *Zim Laboratories* a clairement soutenu que l'échantillon CFD004 ne lui appartenait pas malgré des fortes ressemblances constatées entre les deux produits et n'a pas voulu faire d'autres commentaires quant à ce. Les analyses effectuées sur les deux échantillons ont montré que l'échantillon CFD004 était hors spécification avec une teneur en céfadroxyl de 80,5 %. En revanche, l'échantillon CFD003 était conforme avec 101,89 % de teneur en céfadroxyl.

L'ensemble des considérations évoquées ci-haut, ont permis d'affirmer que sur 102 échantillons considérés dans l'étude, 59 % n'ont pas été conformes selon les informations relatives à leur traçabilité. Ces non conformités ont été dues à plusieurs défauts : absence de l'adresse complète du fabricant (n = 17) ; absence du numéro de l'AMM (n = 44) ; manque des coordonnées de contact du fabricant (n = 4).

Le point suivant aborde les résultats obtenus avec la revue systématique des méthodes chromatographiques liquides et spectrophotométrique UV-Vis.

V.3. REVUE SYSTÉMATIQUE DES MÉTHODES ANALYTIQUES UTILISEES

Cette revue a fait l'objet d'une publication dans *American Journal of Analytical Chemistry*. L'étude a été réalisée en vue de disposer des données sur les méthodes d'analyse appliquées pour la détection des médicaments falsifiés ou de qualité douteuse.

V.3.1. Aspect général

Le diagramme de Prisma repris à la figure 15 schématise la sélection de 41 articles que nous avons retenus pour la revue systématique. Nous avons recouru aux bases de données sur internet : Google Scholar et Pubmed qui ont fourni au départ 853 articles à raison de 62 % pour le premier et 38 % pour le second.

La base des données Pubmed a été utilisée par Koczwara et Dressman (2017) dans leur revue systématique sur la prévalence et les risques des médicaments falsifiés et de qualité inférieure dans le monde. Par contre, Almuzaini *et al* (2013) ont utilisé trois bases des données (Embase, Pubmed, et International Pharmaceutical Abstract) dans leur revue de littérature relative aux médicaments falsifiés et de qualité inférieure.

Les deux bases des données utilisées dans le cadre de ce travail, nous semblent suffisantes car d'une part, Google Scholar est un moteur de recherche qui a une particularité de rechercher sur le Web uniquement des résultats scientifiques ou universitaires. D'autre part, Pubmed présente l'avantage d'accéder à la base bibliographique Medline et contient de références permettant d'identifier les articles scientifiques provenant de plus de 5000 revues à comité de lecture dans le domaine biomédical.

De 853 articles comptabilisé dans les moteurs de recherche retenus. 742 articles ont été exclus de l'étude pour plusieurs raisons (i) ils n'ont pas été publiés entre janvier 2000 et juillet 2017 ; (ii) il s'agissait uniquement d'un contrôle qualité de médicaments ; (iii) il s'agissait d'une simple revue d'articles ; (iv) ils traitaient de méthodes autres que spectrophotométriques UV-visible et chromatographie liquide à haute performance ; (v) le principe actif concerné dans l'étude n'était pas un antibactérien ; (vi) ils traitaient d'autres questions qui ne correspondaient pas à l'objet de notre étude. Cent onze articles ont été considérés (figure 16). De ces 111 articles, 27 étaient exclus car les méthodes spectrophotométriques UV visible et HPLC mises au point ont été développées dans les liquides biologiques (sérum, sécrétions bronchiques, plasma, urine). Il importe de souligner que quatre articles supplémentaires ont été ajoutés après l'examen de la bibliographie des articles.

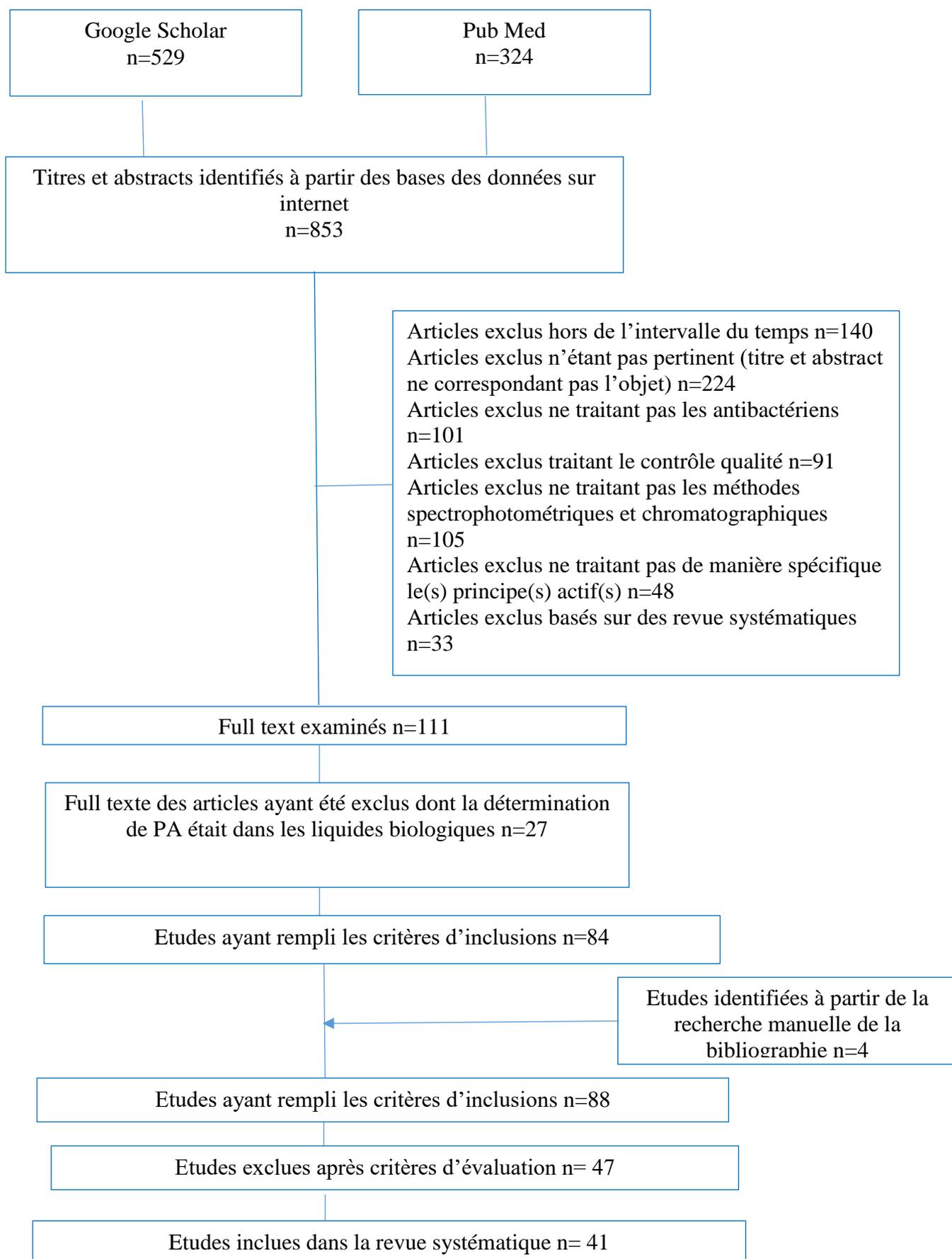


Figure 16. Diagramme de Prisma

Tous les 88 articles n'ont pas rempli les 14 critères d'évaluation établis dans l'étude. Dans 27 articles, 13 critères ont été remplis, 12 l'ont été dans 11 articles, et respectivement 9, 11 et 10 critères dans un, cinq et trois articles. Ceci a donné lieu à un total de 41 études qui ont rempli tous les 14 critères établis dans l'étude.

D'autres auteurs ont également procédé à l'exclusion de plusieurs articles dans leurs revues de littérature. C'est notamment le cas de l'étude menée par Khalifeh *et al* (2017) qui ont exclu 562 publications qui ne cadraient pas avec l'objectif poursuivi dans le travail. Sur 134 full-text examinés dans l'étude, 62 ont été exclus car ils ne remplissaient pas les critères d'inclusion fixés dans l'étude. Quant à Ozawa *et al* (2018), sur 4284 articles rassemblés à partir des bases des données considérées dans l'étude, 754 full-text ont été évalués par rapport aux critères d'inclusion définis dans le travail. Les auteurs ont finalement retenu 96 articles dans leur revue systématique.

V.3.2. Caractéristiques des principes actifs

Concernant les molécules médicamenteuses, 33 principes actifs (tableau XXIII) ont été concernés par la mise au point de méthodes HPLC et spectrophotométrie UV. Trente neuf pour cent (39 %) des principes actifs appartenaient à la famille de bêta-lactamines, 18 % aux quinolones, 12 % aux macrolides, 9 % aux cyclines, 6 % aux lincosamides et 6 % aux nitroimidazolés. Les autres familles (aminoglycosides, inhibiteurs de bêta-lactamase et antituberculeux) n'ont pas enregistré plus de 3 %. Les antibiotiques appartenant à la famille des bêta-lactamines ont donc été les plus représentés dans ces travaux.

Delepierre *et al* (2012) ainsi que Kelesidis et Falagas (2015) ont montré que les antibiotiques appartenant à la famille de bêta-lactamines étaient les plus falsifiés (50 %), suivis de quinolones (12 %), macrolides et lincosamides (11 %) et cyclines (9 %).

Dans cette même optique, nous avons trouvé que l'amoxicilline a été le principe actif le plus étudié par rapport à d'autres. Pourtant, plusieurs études avaient rapporté que l'amoxicilline est l'antibiotique pour lequel les non-conformités sont les plus rapportées dans le monde (Shakoor *et al.*, 1997 ; Nazerali et Hogerzeil, 1998 ; Baratta *et al.*, 2012 ; Hadi *et al.*, 2010 ; Kelesidis et Falagas, 2015 ; Delepierre *et al.*, 2012). Au regard de ces observations, il y a lieu de corréler les principes actifs pour lesquels les méthodes sont mises au point et les antibiotiques falsifiés et de qualité inférieure détectés dans le monde. En d'autres termes, plus les médicaments sont falsifiés plus les méthodes de leur détection sont disponibles.

V.3.3. Caractéristiques des méthodes

Dans 30 articles, la méthode HPLC a été utilisée pour développer et valider les méthodes de dosage des antibactériens, alors que huit études ont recouru à la spectrophotométrie UV visible ; deux études ont simultanément utilisé les deux méthodes. Le choix porté sur la méthode HPLC pour mettre au point les méthodes d'analyse des médicaments peut se justifier par le fait que cette méthode est capable de quantifier et d'identifier des analytes séparés grâce à des détecteurs sensibles et variés par rapport à la spectrophotométrie UV-vis. En revanche, une chaîne HPLC est plus coûteuse. Dans leur étude, Kovacs *et al* (2014) rapportent qu'une chaîne HPLC coûte environ 50.000 USD. De plus, son utilisation nécessite un technicien qualifié, il faut l'électricité en permanence mais aussi une consommation non négligeable de solvants.

V.3.3.1. Méthodes spectrophotométriques

Dans sept études (Amin *et al.*, 2007 ; Ashour et Bayram, 2015 ; Gouda *et al.*, 2011 ; Babu *et al.*, 2014 ; Rufino *et al.*, 2008 ; Salem et Saleh, 2004 ; Salem, 2004), les méthodes spectrophotométriques ont consisté à la formation d'un composé coloré, qui présentait une absorption maximale, mesurable au spectrophotomètre à une longueur d'onde bien précise alors que quatre études (Motwani *et al.*, 2007 ; Souza *et al.*, 2009 ; Hassan *et al.*, 2014 ; Mendez *et al.*, 2003) n'ont pas procédé par la formation d'un composé coloré.

L'amoxicilline a été étudiée dans deux études dont une à 397 nm, cette méthode était basée sur l'oxydation sélective de l'amoxicilline avec le cérium (IV) ou le fer (II) pour donner un produit de coloration jaune intense (Salem et Saleh, 2002) ; une autre étude, a utilisé quatre longueurs d'onde: 390, 520, 435, et 415 nm, l'étude a préconisé quatre procédures : (i) nitration et complexation subséquente avec un réactif nucléophile (ii) nitrosation et chélation subséquente du cuivre (iii) couplage avec le réactif de diazotation et (iv) réaction avec le cuivre qui résulte de l'extraction du chélate dans le chloroforme (Salem, 2004).

Les méthodes de moxifloxacin ont été réalisées par la spectrophotométrie dans deux études à des longueurs d'onde différentes (296, 289, 623 et 660 nm) (Asshour et Bayram, 2015 ; Motwani *et al.*, 2007).

Quant à la méthode spectrophotométrique décrite pour l'azithromycine, elle a été basée sur la réaction d'azithromycine avec le p-chloranil en vue d'obtenir un composé coloré en rouge et mesurable au spectrophotomètre à 540 nm (Rufino *et al.*, 2008).

Le céfadroxil a été concerné dans deux études relatives à la spectrophotométrie UV. Une étude a utilisé quatre longueurs d'onde différentes : 390, 520, 435, et 415 nm (Salem, 2004). Dans

l'autre étude, la longueur d'onde a été de 397 nm et la méthode a été basée sur l'oxydation sélective de l'amoxicilline avec le cérium (IV) ou le fer pour donner un produit de coloration jaune intense (Salem et Saleh, 2002).

La méthode de dosage de céfoperazone a été développée à 390, 520, 435 nm, alors que pour la gatifloxacine, la longueur d'onde a été de 415, 412, 415, 417 et 414 nm en se basant sur la formation de complexes de paires d'ions jaunes entre l'azote basique du médicament et les trois colorants acides de sulfonphtaléine (Amin *et al.*, 2007). Le céfdinir, le céfprozyle, le céftiofur et la gémifloxacine étaient également étudiés en utilisant la spectrophotométrie UV vis.

V.3.2.2. Méthodes HPLC

Toutes les études menées sur HPLC étaient basées sur la chromatographie en phase inversée. L'amoxicilline a été étudiée dans trois études par HPLC. Le système de détection a été réalisé à 215, 254 et 283 nm (Atici *et al.*, 2016 ; Tavakoli *et al.*, 2007 ; Ahmed *et al.*, 2011).

Dans tous les quatre articles, les méthodes développées et validées de la doxycycline ont été effectuées par HPLC à 360, 277, 310 et 410 nm (Kogawa *et al.*, 2013 ; Darwish *et al.*, 2012 ; Elkhoudary *et al.*, 2014 ; Dhal *et al.*, 2015). Les méthodes de moxifloxacine par HPLC ont été réalisées à 254 et 290 nm (Razzaq *et al.*, 2012 ; Djurdjevic *et al.*, 2009). L'étude réalisée par Djurdjevic *et al* 2009 avait permis également de séparer quatre impuretés liées à la synthèse de la moxifloxacine.

Le céfpodoxime et l'azithromycine ont été étudiés dans trois articles. La méthode HPLC a été utilisée pour la mise au point des méthodes de céfpodoxime à 228, 235 et 248 nm (Malalathi *et al.*, 2009 ; Acharya et Patel, 2013 ; Kotkar *et al.*, 2012). Deux méthodes mises au point d'azithromycine ont été également réalisées par HPLC. Le système de détection de l'azithromycine utilisé sur HPLC a été réalisé à 210 et 215 nm (Gaudin *et al.*, 2011 ; Shaikh *et al.*, 2008).

Les méthodes mises au point d'acide clavulanique, de clarithromycine, du métronidazole et d'oxytétracycline ont été réalisées par l'HPLC (Darwish *et al.*, 2012 ; Elkhoudary *et al.*, 2014 ; Atici *et al.*, 2016 ; Malathi *et al.*, 2009 ; Kahsay *et al.*, 2013 ; Symyrnotakis et Archontaki, 2007 ; Tavakoli *et al.*, 2007 ; Sahoo *et al.*, 2016). Deux longueurs d'onde (215 et 228 nm) ont permis de détecter le clavulanate de potassium. La méthode développée d'HPLC a en outre permis de déterminer les substances apparentes de clavulanate de potassium (Atici *et al.*, 2016). Par ailleurs, le système de détection a été réalisé à 319 nm pour le métronidazole, 253 nm pour oxytétracycline ainsi que 210 et 277 nm pour clarithromycine. En plus de la description de méthode de dosage de l'oxytétracycline, Khasay *et al* (2013) ont séparé l'oxytétracycline de

toutes ses impuretés connues et cinq autres impuretés inconnues. Dans deux articles distincts, une même longueur d'onde a été utilisée dans la mise au point de méthode de dosage HPLC du métronidazole et de l'oxytétracycline (Tavakoli *et al.*, 2007 ; Kaysay *et al.*, 2013).

Quant au céfopérazone (Elkady et Abbas, 2011 ; Salem, 2004) et gatifloxacine (Venugopal *et al.*, 2007 ; Amin *et al.*, 2007) la longueur d'onde a été réalisée par HPLC avec un système de détection UV à 230 nm pour le céfoperazone et 292 nm pour la gatifloxacine. Par ailleurs, les autres principes actifs (céfzopran, céfpirome, ceftrizoxime, clindamycine, démeclocycline, dicloxacillin, enrofloxacin, imipenem, lévofloxacin, lincomycine, meropenem, norfloxacin, rifampicine, roxithromycine, spectinomycine et tinidazole) n'ont fait l'objet de la mise au point de méthode HPLC dans un seul article comme indiqué dans le tableau XXIII.

Nous avons noté que deux articles distincts ont utilisé une même longueur d'onde (210 nm) pour décrire la méthode HPLC de l'amoxicilline et azithromycine (Atici *et al.*, 2016 ; Shaikh *et al.*, 2008). En outre, trois articles distincts ont utilisé une même longueur d'onde (254 nm) pour décrire la méthode HPLC de l'amoxicilline, métronidazole, moxifloxacine et oxytétracycline (Tavakoli *et al.*, 2007 ; Razzaq *et al.*, 2012 ; Kaysay *et al.*, 2013).

Tableau XXIII. Caractéristiques des méthodes basées sur la HPLC et spectrophotométrie UV visible

Principe actif	Nbre de fois utilisé	Type de méthode	Diluant	Phase mobile	Détection UV (nm)	Type de colonne	Réf
Acide Clavulanique	2	HPLC	Eau	Méthanol/KH ₂ PO ₄ : 95÷5	215	C ₁₈	Atici <i>et al.</i> , 2017
		HPLC	Acétonitrile/eau : 1÷1	Acétonitrile/KH ₂ PO ₄ 70÷30	228	C ₁₈	Malathi <i>et al.</i> , 2009
Amoxiciline	5	HPLC	Eau	Méthanol/KH ₂ PO ₄ : 95÷5	215	Idem	Atici <i>et al.</i> , 2017
		Spectro UV-Vis.	Méthanol/eau: 2÷98		397		Salem et Saleh, 2002
		HPLC	KHPO ₄	Méthanol/KHPO ₄ : 5÷95	254	Idem	Tavakoli <i>et al.</i> , 2007
		Spectro UV-Vis	HNO ₃ :H ₂ SO ₄ :eau(2 ÷2÷96)		390, 520, 435, 415		Salem, 2004
		HPLC	KH ₂ PO ₄ /méthanol (95÷5)	Méthanol/KH ₂ PO ₄ : 5÷95	283	Idem	Ahmed <i>et al.</i> , 2011
Azytromicine	3	HPLC	Méthanol	Méthanol/H ₃ PO ₄ : 80÷20	210	Idem	Gaudin <i>et al.</i> , 2011
		Spectro UV-Vis	Méthanol		540		Rufino <i>et al.</i> , 2008
		HPLC	Acétonitrile:eau:40 ÷60	Acétonitrile/KH ₂ PO ₄ : 50÷50	215		Shaikh <i>et al.</i> , 2008
Cefadroxylyle	2	Spectro UV-Vis	Méthanol/eau:2÷98		397		Salem et Saleh 2002
		Spectro UV-Vis	HNO ₃ :H ₂ SO ₄ :eau:2 ÷2÷96		390, 520, 435, 415		Salem 2004
Cefdinir	1	Spectro UV-Vis	Méthanol		210		Gouda <i>et al.</i> , 2011
Cefoperazone	2	HPLC	Eau	KHPO ₄ /acétonitrile: 80÷20	230	Idem	Elkady et Abbas 2011
		Spectro UV-Vis	HNO ₃ /H ₂ SO ₄ /eau: 2÷2÷96		390, 520, 435, 415		Salem 2004

Tableau XXIII. Caractéristiques des méthodes basées sur la HPLC et spectrophotométrie UV visible

Principe actif	Nbre de fois utilisé	Type de méthode	Diluant	Phase mobile	Détection UV (nm)	Type de colonne	Réf
Cefozopran	1	HPLC	Eau	Aeetate d'ammonium/acétonitrile 92÷8	260	Idem	Zalewski <i>et al.</i> , 2015
Cefpirome	1	HPLC	Eau	Acétate d'ammonium/acétonitrile: 90÷10	270	Idem	Zalewski <i>et al.</i> , 2014
Cefpodoxine	3	HPLC	Acétonitrile/eau:1÷1	Acétonitrile/KH ₂ PO ₄ : 70÷30	228	Idem	Malathi <i>et al.</i> , 2009
		HPLC	Acétonitrile/méthanol/eau:20÷50÷30	Acétonitrile/méthanol/trifluor'acetate:30÷50÷20	235	Idem	Acharya et Patel 2013
		HPLC	Méthanol	Acétonitrile/KH ₂ PO ₄ : 70÷30	248	Idem	Kotkar <i>et al.</i> , 2012
Cefprozyle	1	Spetro UV-Vis	Méthanol/eau:2÷98		397		Salem et Saleh 2002
Ceftiofur	1	Spetro UV-Vis	Eau		292		Souza <i>et al.</i> , 2009
Ceftrizoxime	1	HPLC	Méthanol/eau:20÷80	Méthanol/eau:20÷80	290	Idem	Sanli <i>et al.</i> , 2011
Claritromicine	2	HPLC	Méthanol	Phase mobile A: méthanol/KH ₂ PO ₄ /triéthylamine : 30÷69,7÷0,3. Phase mobile B: acétonitrile	277	Idem	Darwish <i>et al.</i> , 2012
		HPLC	Methanol	Phase mobile A: KH ₂ PO ₄ /acide octanesulfonique:5÷1 phase B: acétonitrile	210	Idem	Elkhoudary <i>et al.</i> , 2014
Clindamycine	1	HPLC	Acétonitrile/HCl0,1N:50÷50	PhaseA: carbonate/acetonitrile:90÷10. Phase B: carbonate:acetonitrile:20÷80	214	Idem	Platzer <i>et al.</i> , 2006

Tableau XXIII. Caractéristiques des méthodes basées sur la HPLC et spectrophotométrie UV visible

Principe actif	Nbre de fois utilisé	Type de méthode	Diluant	Phase mobile	Détection UV (nm)	Type de colonne	Réf
Demeclocycline	1	HPLC	HCl 0,01M	Phase A:acétonitrile:edelate deNa:tetrapropylammoni um phosphate hydrogene:eau/2:35÷35÷ 28. Phase B: 30÷35÷35.	280	Idem	Kahsay <i>et al.</i> , 2012
Dicloxacilline	1	HPLC	Acétonitrile/méthanol: ol:eau(20÷50÷30)	Acétonitrile/méthanol/ acétatede trifluor:30÷50÷20	235	Idem	Acharya et Patel 2013
Doxycycline	4	HPLC	HCl 0,001M	Eau/acétonitrile : 60÷40	360	Idem	Kogawa <i>et al.</i> , 2013
		HPLC	Méthanol	Phase mobile : A: méthanol/KH ₂ PO ₄ /triéthyl amine:30÷69,7÷0,3. Phase mobile B: acétonitrile	277	Idem	Darwish <i>et al.</i> , 2012
		HPLC	Méthanol	Phase mobile A: KH ₂ PO ₄ /acide octanesulfonique:5÷1 phase B: acetonitrile	310	Idem	Elkhoudary <i>et al.</i> , 2014
Enrofloxacin	1	HPLC	KH ₂ PO ₄ et méthanol (2:8)	KH ₂ PO ₄ /méthanol: 3÷7	400	Idem	Dhal <i>et al.</i> , 2015
		HPLC	Acétonitrile/KH ₂ PO ₄ :75÷ 4:75÷25	Acétonitrile/KH ₂ PO ₄ :75÷ 25	267	Idem	Batravi <i>et al.</i> , 2017
Gatifloxacin	2	HPLC	Citrate/acétonitrile : 52÷48	Citrate/acétonitrile :52÷4 8	292	Idem	Venugopal <i>et al.</i> , 2007
		Spetro UV-Vis	Eau		412, 415, 417, 414		Amin <i>et al.</i> , 2007
Gemifloxacin	1	Spetro UV-Vis	Méthanol		270,0		Hassan <i>et al.</i> , 2014

Tableau XXIII. Caractéristiques des méthodes basées sur la HPLC et spectrophotométrie UV visible

Principe actif	Nbre de fois utilisé	Type de méthode	Diluant	Phase mobile	Détection UV (nm)	Type de colonne	Réf
Imipenem	1	HPLC	Méthanol/eau 50÷50	Méthanol/ac phosphoric 60÷40	225	Idem	Babu <i>et al.</i> , 2014
		Spetro UV-Vis	Eau		525		
Josamycine	1	HPLC	Acétonitrile/eau : 3÷7	Acétonitrile/phosphat/tétr abutylammonium/ eau :21÷5÷3÷71	232		Dadione <i>et al.</i> , 2008
Levofloxacin	1	HPLC	Acétonitrile/eau :1÷ 1	Eau/acétonitrile :6÷5	260, 265, 270, 275, 280	Idem	Arayne <i>et al.</i> , 2007
Lyncomycine	1	HPLC	Ethanol	Acétonitrile/tampon phosphate :89÷11	220	Idem	Abualhasan <i>et al.</i> , 2012
Meropenem	1	HPLC	Eau	KH ₂ PO ₄ /acétonitrile :9÷1	298	Idem	Mendez <i>et al.</i> , 2003
		Spetro UV-Vis	Eau		298		
Metronidazole	2	HPLC	KHPO ₄	KH ₂ PO ₄ /méthanol : 95÷5	254	Idem	Tavakoli <i>et al.</i> , 2007
		HPLC	Acétonitrile/méthanol :80÷20	NaHPO ₄ /acétonitrile 65÷35	319	Idem	Sahoo <i>et al.</i> , 2016
Moxyfloxacin	4	HPLC	Méthanol	Méthanol/KH ₂ PO ₄ :62÷3 8	254	Idem	Razzaq <i>et al.</i> , 2012
		Spetro UV-Vis	Eau		623, 660		Asshour et bayram 2015
		HPLC	acide phosphorique 0,1%	Eau/acétonitrile:90÷10	290	Idem	Djurdjevic <i>et al.</i> , 2009
		Spetro UV-Vis	HCl0,1N/ phosphate (1÷1)		296, 289		motwani <i>et al.</i> , 2007

Tableau XXIII. Caractéristiques des méthodes basées sur la HPLC et spectrophotométrie UV visible

Principe actif	Nbre de fois utilisé	Type de méthode	Diluant	Phase mobile	Détection UV (nm)	Type de colonne	Réf
Norfloxacine	1	HPLC	Méthanol	Phase mobile A: KH_2PO_4 /acide octanesulfonique: 5÷1. phase B: acétonitrile	310	Idem	Elkoudary <i>et al.</i> , 2014
Oxytetracycline	2	HPLC	HCl 0,01M	Phase A: acide trifluoroacétique phase B: acétonitrile/méthanol/tétrahydrofur : 80÷15÷5	254	Idem	Kahsay <i>et al.</i> , 2013
		HPLC	Méthanol	Méthanol/acétonitrile/phosphate : (12,5÷12,5÷75)	253	Idem	Symyriotakis et Archontaki 2007
Rifampicine	1	HPLC	Acétonitrile/ KH_2PO_4 : 50÷50	Acétonitrile/ KH_2PO_4 : 50÷50	238	Idem	Kumar <i>et al.</i> , 2014
Roxithromycine	1	HPLC	Ethanol	Acétonitrile/ KH_2PO_4 : 50÷50	205	Idem	Aucamp <i>et al.</i> , 2015
Spectinomycine	1	HPLC	Acétonitrile/phosphate:89÷11	Acétonitrile/phosphate:89÷11	220	Idem	Abualhasan <i>et al.</i> , 2012
Tinidazole	1	HPLC	Méthanol	Phase mobile A: KH_2PO_4 :octanesulfonique:5÷1. phase B: acétonitrile	310	Idem	Elkoudary <i>et al.</i> , 2014

V.3.4. Diluants

Dans la phase de préparation des échantillons, l'utilisation de diluant est incontournable, qu'il s'agisse de la spectrophotométrie ou de la HPLC. Dans ce travail, l'eau a été le diluant le plus utilisé (neuf articles) pour mettre au point les méthodes dosage de 10 molécules médicamenteuses : acide clavulanique, amoxicilline, céfoperazone, céfopran, céfpirome, céftiofur, gatifloxacin, imipenem, méropenem et moxifloxacin. De ces neuf articles, l'eau a été utilisée dans quatre études (Atici *et al.*, 2016 ; Elkady et Abbas, 2011 ; Zalewski *et al.*, 2014 ; Zalewski *et al.*, 2015) qui concernaient l'HPLC, quatre autres la spectrophotométrie UV-Vis (Souza *et al.*, 2009 ; Amin *et al.*, 2007 ; Babu *et al.*, 2014 ; Ashour et Bayram, 2015) et une étude a utilisé l'eau pour développer à la fois la méthode spectrophotométrique UV-Vis et HPLC (Mendez *et al.*, 2003). Le méthanol a été utilisé comme diluant dans huit articles (cinq pour HPLC et trois pour spectrophotométrie) pour neuf principes actifs (azithromycine, céfdinir, céfpodoxine, clarithromycine, gémifloxacin, norfloxacin, moxifloxacin, oxytétracycline et tinidazole).

Il est établi que le choix d'un solvant dépend des caractéristiques physico-chimiques des molécules à l'étude. L'eau a été le solvant le plus utilisé, suivi de méthanol. L'utilisation de l'eau présente de nombreux avantages tels que la facilité d'emploi et les risques pour le manipulateur et pour l'environnement, (Simon et Li, 2011 ; Faller *et al.*, 2007). Elle est aussi peu coûteuse. Cependant, plusieurs médicaments sont souvent peu solubles dans l'eau et leur solubilité devrait être augmentée.

En ce qui concerne les molécules pour lesquelles l'eau a été utilisée comme solvant, six d'entre-elles appartenaient à la famille de bêta-lactamines. Ceci serait logique parce que les bêta-lactamines, pénicillines et céphalosporines, sont des acides faibles caractérisés par une polarité élevée et qui forment des sels solubles dans l'eau (Gordilo *et al.*, 1999). Toutefois, quelques études ont montré la solubilité des bêta-lactamines dans d'autres solvants comme l'acétate d'éthyle, le dioxyde de carbone supercritique, le mélange éthanol+eau, ... (Jing *et al.*, 2010 ; Wei *et al.*, 2015 ; Hanaki *et al.*, 2001). Par ailleurs, bien que les quinolones soient aussi des acides faibles, leur solubilité aqueuse est aussi faible (Turel *et al.*, 2002). En effet, dans leur étude, Zhang et Wang (2008) ont déterminé expérimentalement la solubilité des quinolones dans l'eau, montrant que l'ofloxacin, la norfloxacin, la lomefloxacin, la ciprofloxacine, la pefloxacin, et l'acide pipémidique présentent une faible solubilité aqueuse. Par ailleurs, la moxifloxacin étudiée par Varanda *et al.* (2006) était plus soluble dans l'eau que dans d'autres solvants comme l'éthanol et l'acétone.

V.3.5. Phases mobiles et paramètres de validation

Le choix de la phase mobile dépend de la nature des composés à séparer et l'utilisation de phases mobiles tamponnées est parfois souhaitable pour assurer la séparation et la stabilité des analytes en cours d'analyse (*Subirats et al.*, 2007). Dans ce travail, les mélanges acétonitrile : tampon phosphate ont été les plus utilisés (11 articles) dans la mise au point des méthodes d'azithromycine, céfopérazone, céfpodoxine, enrofloxacin, gatifloxacin, métronidazole, lincomycine, meropenem, rifampicine, roxithromycine et spécitnonmycine, alors que le mélange méthanol : tampon a été utilisé dans 5 articles pour la mise au point des méthodes d'analyse de l'amoxicilline, de clarithromycine, de la doxycycline, du métronidazole et de la moxifloxacin. Il convient de souligner que dans les deux cas (acétonitrile/tampon et méthanol/tampon), le tampon a été constitué de solution aqueuse contenant le tampon phosphate, à l'exception de l'étude menée par *Abualhassan et al* (2012).

Deux articles (*Kotkar et al.*, 2012 ; *Malathi et al.*, 2009) ont utilisé une même phase mobile (acétonitrile/tampon KH_2PO_4) avec des proportions identiques (70÷30) pour un même principe actif (céfpodoxine), à l'exception de la longueur d'onde (248 et 228 nm) et de diluant (méthanol/acétonitrile/eau). Trois articles (*Kumar et al.*, 2014, *Aucamp et al.*, 2015 ; *Shaikh et al.*, 2008) ont également utilisé une même phase mobile (acétonitrile/tampon phosphate) à des proportions identiques (50÷50) mais pour trois principes actifs différents (rifampicine, roxithromycine et azithromycine) comme il est détaillé dans le tableau XXIII.

Il a été rapporté que l'acétonitrile est le solvant organique préféré en chromatographie liquide à haute performance. Avec des phases mobiles contenant des solvants organiques autres que l'acétonitrile, les analytes peuvent être insuffisamment retenus et les pics peuvent être larges ou non symétriques (*Welch et al.*, 2009 ; *Jandera*, 2011). Cependant, l'acétonitrile présente un certain nombre d'inconvénient notamment sa toxicité et son coût par rapport à d'autres solvants comme l'acétone et le méthanol.

Les paramètres de validation (spécificité, précision, exactitude, robustesse, linéarité, coefficient de corrélation et limite de détection et de quantification) ont été démontrés dans tous les articles retenus et les résultats ont indiqué la validité de ces méthodes.

Cette revue systématique avait pour objectif de résumer les méthodes HPLC et spectrophotométrie UV-Vis développées et validées puis publiées au cours de ces dernières années afin (i) d'évaluer l'impact de ces méthodes dans la lutte contre la circulation des médicaments FQI et (ii) d'avoir une compréhension globale de ces méthodes.

A l'issue de cette étude, il a été constaté que les antibiotiques les plus falsifiés dans le monde sont ceux pour lesquels les méthodes analytiques sont développées et validées. Cependant, la traque des médicaments de mauvaise qualité ne peut pas connaître un répit dans la mesure où les falsificateurs dans ce domaine ne s'avouent pas vaincus. Malgré la mise au point des méthodes de détection de médicaments FQI, les falsificateurs continuent à développer des stratégies pour que leurs médicaments échappent à la détection. Cette situation peut être aggravée dans les pays où les contrôles ne sont faits et que la réglementation est déficiente.

La recherche peut également s'employer en vue de diversifier, d'actualiser et de performer les méthodes de détection. En plus, étant donné que les médicaments FQI sont davantage consommés dans les pays à revenu faible, il est souhaitable que les méthodes proposées soient accessibles, financièrement et techniquement réalisables et qui font appel à un minimum d'infrastructure. Nous suggérons donc que les méthodes de dosage des médicaments proposées prennent en compte ces aspects.

Le point ci-après présente les résultats du développement, validation et application des méthodes séparatives obtenus dans notre travail.

V.4. DÉVELOPPEMENT, VALIDATION ET APPLICATION DES MÉTHODES SEPARATIVES

V.4.1. Développement des méthodes séparatives

Quatre substances actives ; azithromycine, céfadroxyl, chloramphénicol et érythromycine ont été concernées par la phase de développement de méthodes basées sur la chromatographie liquide à haute performance. Des expériences ont été effectuées afin d'obtenir une condition expérimentale appropriée pour les quatre analytes précités

V.4.1. 1. Méthode d'analyse de l'azithromycine et de l'érythromycine

S'agissant de ces deux macrolides, les expérimentations ont été effectuées en prenant en compte trois facteurs :

- La température du four de la colonne ;
- Le pH de la solution aqueuse (constituée de 10 mM d'acétate d'ammonium) et ;
- Le temps de gradient.

La température du four de la colonne a été variée à trois différents niveaux : 25°C, 30°C et 35°C. Les variations du pH de la solution aqueuse ont été également effectuées en considérant trois niveaux : 3, 6 et 10. Par contre, le temps de gradient a été fixé à 18 et 25 minutes (la proportion du méthanol dans la phase mobile était modifiée de 5 % à 80 %) (tableau XXIV). Nous avons au total effectué 12 expériences pour déterminer les conditions analytiques optimales.

Tableau XXIV. Mode d'élution gradient appliqué dans la phase de développement d'azithromycine et d'érythromycine

Temps (minutes)	Proportion en méthanol (%)	Proportion en tampon (%)
0	5	95
3	5	95
18	80	20
20	80	20
20.5	5	95
30	5	95

Plus la température du four de la colonne était élevée, plus le pic était étroit. D'où, nous avons retenu la température du four à 35°C. Par ailleurs, toutes les variations effectuées en fixant le

pH de la solution aqueuse d'acétate d'ammonium 10 mM à 3 et à 6 n'ont pas abouti à l'élution du pic d'azithromycine et d'érythromycine.

Après avoir testé différents gradients, nous avons décidé de passer en mode isocratique. Considérant que l'apparition du pic chromatogramme de deux macrolides intervenait entre la 18^{ème} et 20^{ème} minute au cours de l'élution, nous avons retenu la troisième séquence ayant la proportion du méthanol/tampon acétate (80÷20) pour passer en mode isocratique. Ainsi donc, les conditions expérimentales finales retenues pour la méthode d'analyse de l'azithromycine et de l'érythromycine ont été les suivantes : pH 10, température de colonne 35°C, mode isocratique : méthanol/tampon acétate d'ammonium 10mM (80÷20). Le tableau XXVI reprend les conditions expérimentales finales et détaillées de la méthode d'analyse de deux macrolides. Le facteur de tailing des pics chromatogrammes d'azithromycine et d'érythromycine était compris entre 1,4 et 1,9 (tableau XXV). Le temps de rétention de l'azithromycine a été de 4.95 min et 2.64 minutes pour l'érythromycine (figure 17).

Tableau XXV. Paramètres chromatographiques d'évaluation retenus de la méthode d'analyse de l'azithromycine et de l'érythromycine

Paramètres	Azithromycine	Erythromycine
Temps de rétention	4,95	2,46
Temps de rétention relatif	1,00	2,01
Nombre des plateaux théoriques	9842,48	9842,48
Résolution entre les deux macrolides	3,45	3,45
Facteur de Tailing	1,90	1,42

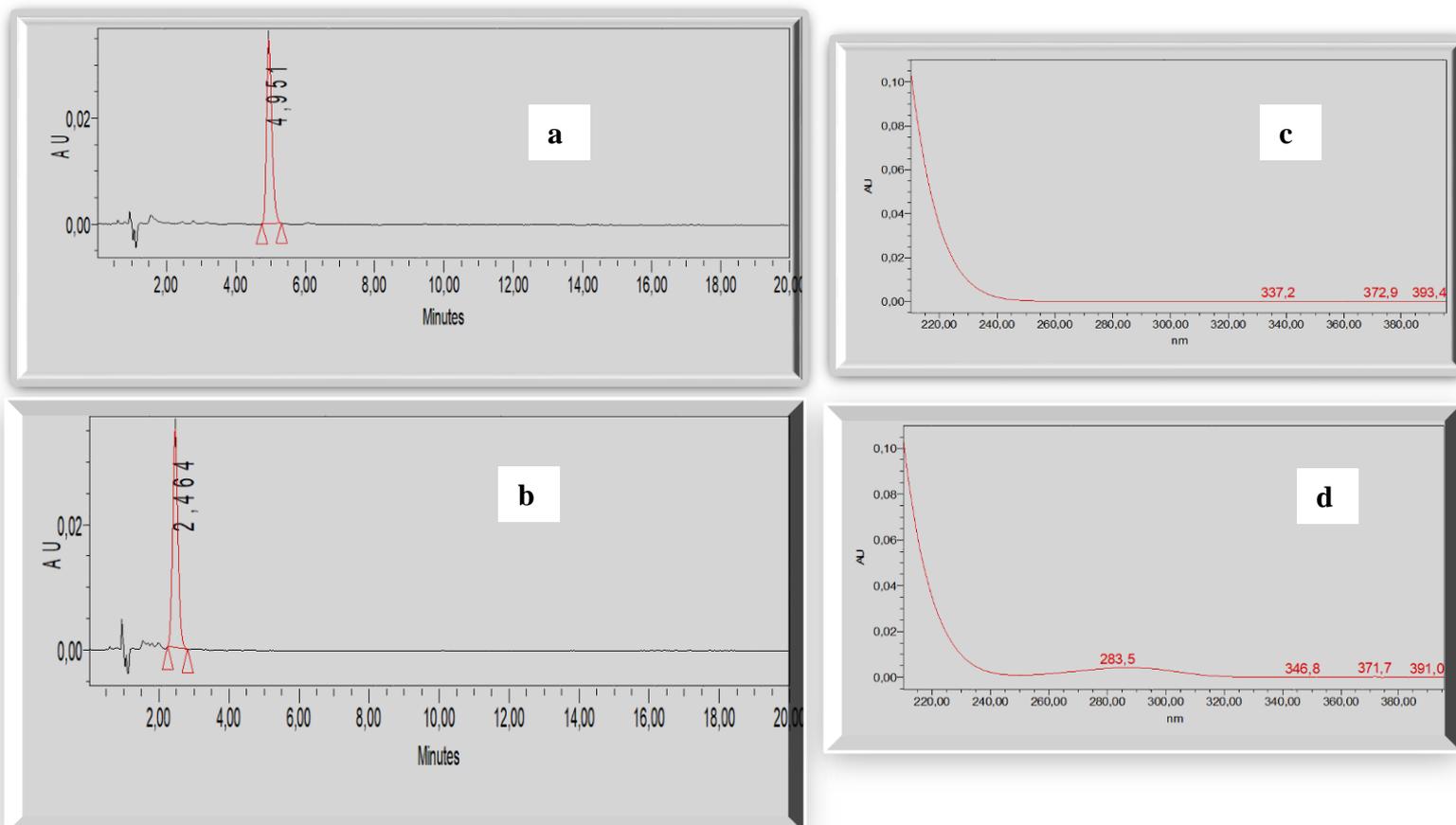


Figure 17. Chromatogrammes et spectres UV obtenus de a : de l'azithromycine ; b : de l'érythromycine ; c : spectre UV de l'azithromycine ; d : spectre UV de l'érythromycine.

Mahmoudi *et al.*, (2016) avaient étudié les deux macrolides sur une C_{18} 250 mmx4,6 mm ; 5 μ m avec une phase mobile composée d'acétonitrile : isopropanol : tampon phosphate (33÷7÷60) pH 6,5. Les auteurs avaient obtenu un temps de rétention de 9 min pour érythromycine et 13 min pour azithromycine. De leur part, Assi *et al.*, (2017) avaient aussi mis au point une méthode d'analyse de l'azithromycine sur une C_{18} 250 mm x 4,6 mm ; 5 μ m avec comme phase mobile composée d'acétonitrile : tampon ammonium (82÷18) pH 6,8 et le temps de rétention obtenu était de 7,95 minutes. Les temps de rétention trouvés par les auteurs précités sont donc inférieurs à ce qui a été trouvé dans notre étude. L'infériorité du temps d'analyse peut en effet, avoir un impact sur le coût d'analyse.

Tableau XXVI. Conditions chromatographiques finales d'analyse de l'azithromycine et de l'érythromycine : Mode d'élution isocratique

Caractéristiques de colonne	xBridge C18 (100 mm x 4,6 mm diamètre, dimension des particules 3,5 µm)
Phase mobile	Méthanol/tampon acétate d'ammonium : 80÷20
Débit	1mL/min
Volume d'injection	10 µL
Température du four	35°C
Détection	PDA 220nm
pH du tampon	10 (Tamponné avec NaOH dilué)

V.4.1.2. Méthode d'analyse de Céfadroxyl et chloramphénicol

La proportion du méthanol dans la phase mobile a été modifiée de 8 % à 95 % et le temps de gradient a été fixé à 30 min. Le mode d'élution isocratique a été réalisé avec 95 % du méthanol et 5 % de la solution aqueuse du tampon d'acétate d'ammonium pendant 10 minutes tel qu'il est montré dans le tableau XXVII.

Tableau XXVII. Mode d'élution gradient appliqué dans la phase de développement de céfadroxyl et chloramphénicol (temps d'analyse 60 minutes)

Temps (minutes)	Proportion en méthanol (%)	Proportion en tampon (%)
0	8	92
30	95	5
40	95	5
41	8	92
60	8	92

Cependant, étant donné que les caractéristiques de colonne (*xBridge C₁₈* 100 mm x 4.6 mm, 3.5 µm) dont nous disposions étaient différentes de celle utilisée dans la méthode générique d'analyse de 19 antibiotiques (*xBridge C₁₈* (250mmx4.6 mm diamètre, dimension des particules 5 µm), nous avons procédé à l'ajustement du débit selon l'équation suivante (Pharmacopée européenne, 2016) :

$$F_2 = F_1 \frac{l_2 d_2^2}{l_1 d_1^2}$$

F₁: débit indiqué dans la monographie, en minutes

F₂: débit ajusté, en minutes

l₁: longueur de la colonne indiquée dans la monographie, en mm

l₂: longueur de la colonne utilisée en mm

d₁: diamètre interne de colonne indiqué dans la monographie

d₂: diamètre interne de la colonne utilisée, en mm

Tableau XXVIII. Paramètres chromatographiques d'évaluation de la méthode de céfadroxyl et du chloramphénicol

Paramètres	Céfadroxyl	Chloramphénicol
Temps de rétention	2,68	13,16
Temps de rétention relatif	4,92	1,00
Nombre des plateaux théoriques	9842,48	9842,48
Résolution	8,06	8,06
Facteur de Tailing	1,00	1,01

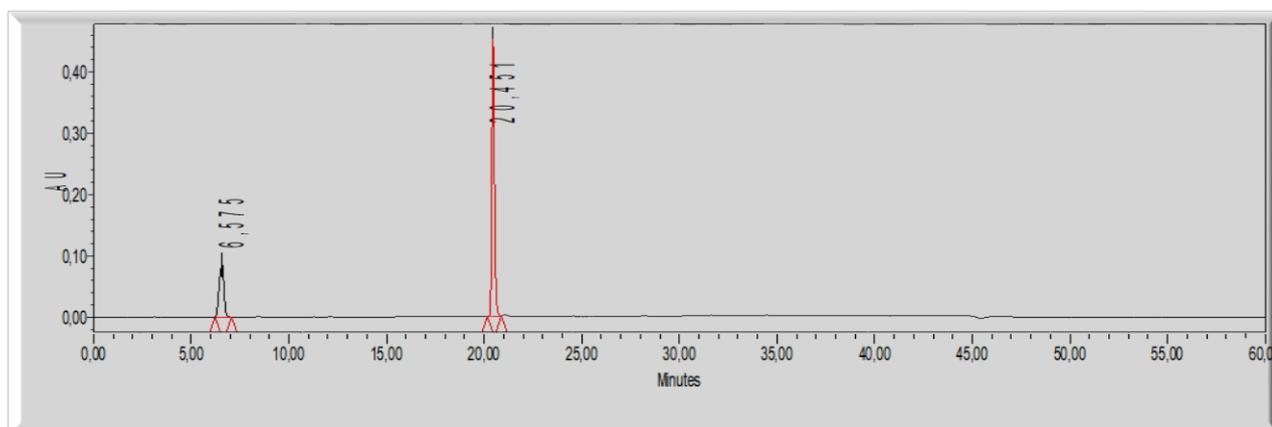


Figure 18. Chromatogrammes obtenus de céfadroxyl et chloramphénicol avec un débit de 0.4 mL/min (temps d'analyse 60 min)

Cet ajustement a donné un débit de 0,4 mL/min. Le temps de rétention de céfadroxyl obtenu avec ce débit a été de 6,7 min et 20.45 min pour le chloramphénicol (figure 18).

Les dimensions des particules (3,5 μm) de la colonne pouvaient supporter un débit supérieur à 0,4 mL/min, nous avons à cet effet, ajusté le débit à 1mL/min. Ceci a permis de trouver un temps de rétention de 2,7 min de céfadroxyl et 13,2 min pour le chloramphénicol (figure 19). En outre, nous avons fixé le temps d'analyse à 25 min (tableau XXIX) car les pics des analytes concernés apparaissaient avant 20 minutes ; cette réduction du temps s'est réalisée en diminuant le temps de gradient tout en maintenant la pente.

Tableau XXIX. Mode d'élu­tion gradient appliqué dans la phase de développement de céfadroxil et chloramphénicol (temps d'analyse 25 minutes)

Temps (minutes)	Proportion en méthanol (%)	Proportion en tampon (%)
0	8	92
15	41	59
20	41	59
21	8	92
25	8	92

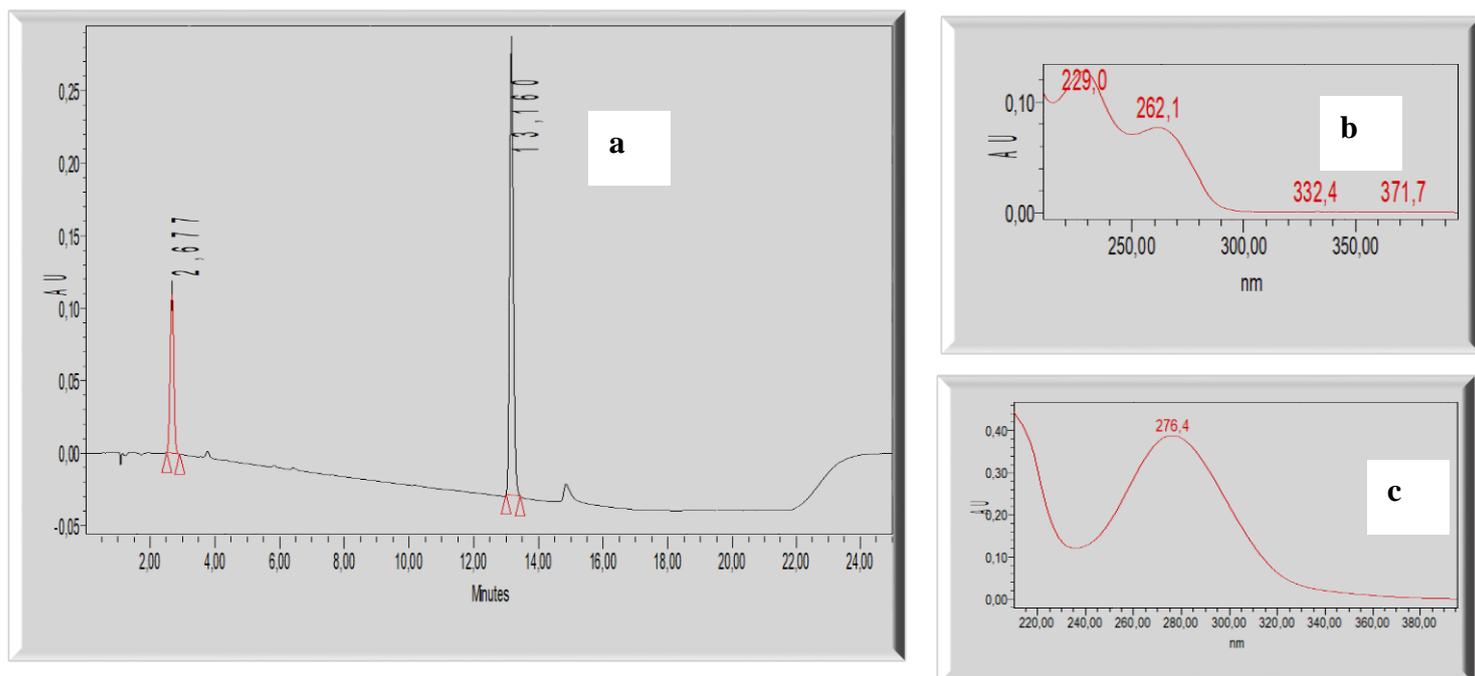


Figure 19. (a) Chromatogramme de céfadroxil et chloramphénicol ayant un débit de 1ml/min (temps d'analyse 25 minutes) ; (b) : spectre UV de chloramphénicol ; (c) : spectre UV de céfadroxil

Le facteur de *Tailing* a donné des valeurs comprises entre 1,0 et 1,1 (tableau XXVIII). La résolution des pics de céfadroxil et chloramphénicol était bonne avec des valeurs supérieures à 3. S'agissant du temps de rétention de céfadroxil (2.7 min), nous avons par la suite utilisé le mode isocratique car ce mode présente un certain nombre d'avantage notamment : sa simplicité, pas de problème de ligne de base et pas besoin d'équilibrer la colonne à chaque *run*. Le tableau XXX reprend les conditions analytiques finales de la méthode de céfadroxil et chloramphénicol.

Tableau XXX. Conditions chromatographiques de céfadroxyl et chloramphénicol : mode isocratique

Caractéristiques de colonne	xBridge C18 (100mmx4.6 mm diamètre, dimension des particules 3.5 µm)
Phase mobile	tampon (acetate d'ammonium) : méthanol (95:5)
Débit	1mL/min
Volume d'injection	10 µL
Température du four	25°C
Détection	PDA 220nm
pH du tampon	6 (tamponné avec HCl dilué)

D'autres chercheurs ont développé la méthode de dosage de céfadroxyl, c'est notamment l'étude menée par De-Marco et Salgado (2017) qui avaient développé une méthode d'analyse de céfadroxyl sur une C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) avec une phase mobile constituée d'éthanol : eau acidifié (8 :92), le temps de rétention était de 6.1 minutes. De leur part, Sharif *et al* (2010), avaient obtenu un temps de rétention d'environ 5 minutes sur une C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm), phase mobile : tampon phosphate : acétonitrile (94 :06).

V.4.2. Validation des méthodes séparatives

Après l'étape du développement des deux méthodes, il était nécessaire de montrer qu'elles fournissent des résultats fiables avec une exactitude et une précision déterminée. Les méthodes pour l'azithromycine et le céfadroxil ont été à cet effet validées. La validation des méthodes d'analyse s'est réalisée selon les directives de l'ICH Q₂ (R₁) (ICH, 2008). La stratégie de l'erreur totale représentée par le profil d'exactitude a été utilisée comme outil décisionnel dans la validation (Hubert *et al.*, 2007 ; Hubert *et al.*, 2008). Les paramètres suivants ont été pris en compte dans le protocole de validation :

- Sélectivité,
- Justesse, fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire),
- Exactitude, linéarité,
- Limite de détection et de quantification et
- Intervalle de dosage.

a) Sélectivité

Nous avons démontré que les méthodes d'analyse développées de l'azithromycine et du céfadroxil étaient sélectives. Cette sélectivité a été réalisée en injectant d'abord le blanc seul, la matrice seule, les standards seuls puis le mélange standard+matrice.

Aucune interférence n'a été observée entre la matrice et les pics des analytes (figure 20). En outre, les temps de rétention et les spectres UV vis de ces deux substances médicamenteuses n'ont pas été impactés par la présence de la matrice.

Nous avons eu l'opportunité de déterminer la sélectivité de l'azithromycine sur un autre type de colonne (*Kinetex* C18 ; 100 mm x 4.6 mm diamètre, dimension des particules 3.5 µm), en prenant en compte les impuretés susceptibles de l'accompagner (impuretés C, obtenues auprès de la Pharmacopée Européenne). Les concentrations des impuretés et de l'azithromycine étaient de 500 µg/mL. La figure 21 montre une bonne résolution de l'azithromycine par rapport à ces impuretés.

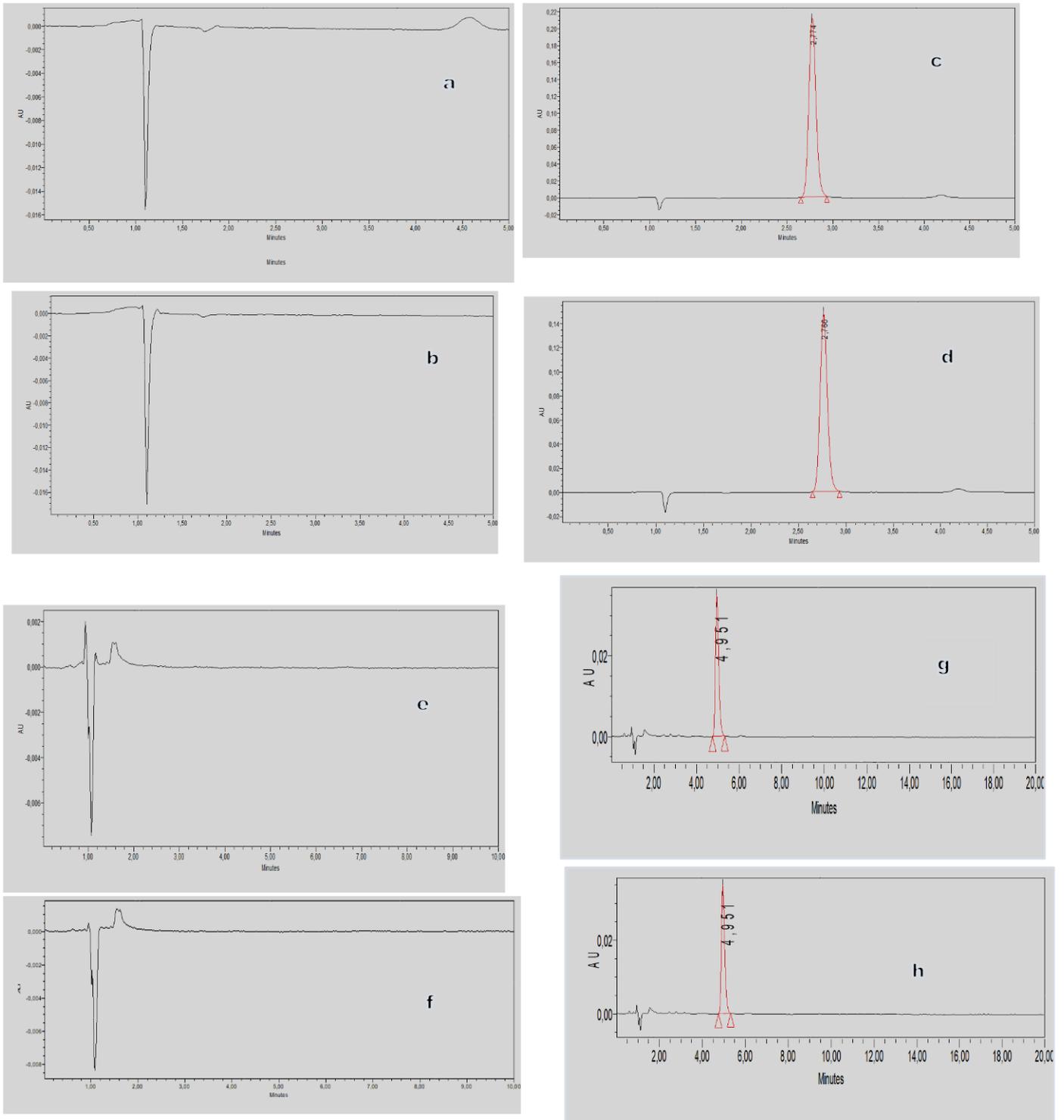


Figure 20. La sélectivité des méthodes : a) matrice céfadroxyl ; b) blanc cefadroxyl ; c) standard céfadroxyl ; d) céfadroxyl+matrice ; e) matrice azithromycin ; f) blanc azithromycine ; g) standard azithromycine ; h) azithromycine+matrix

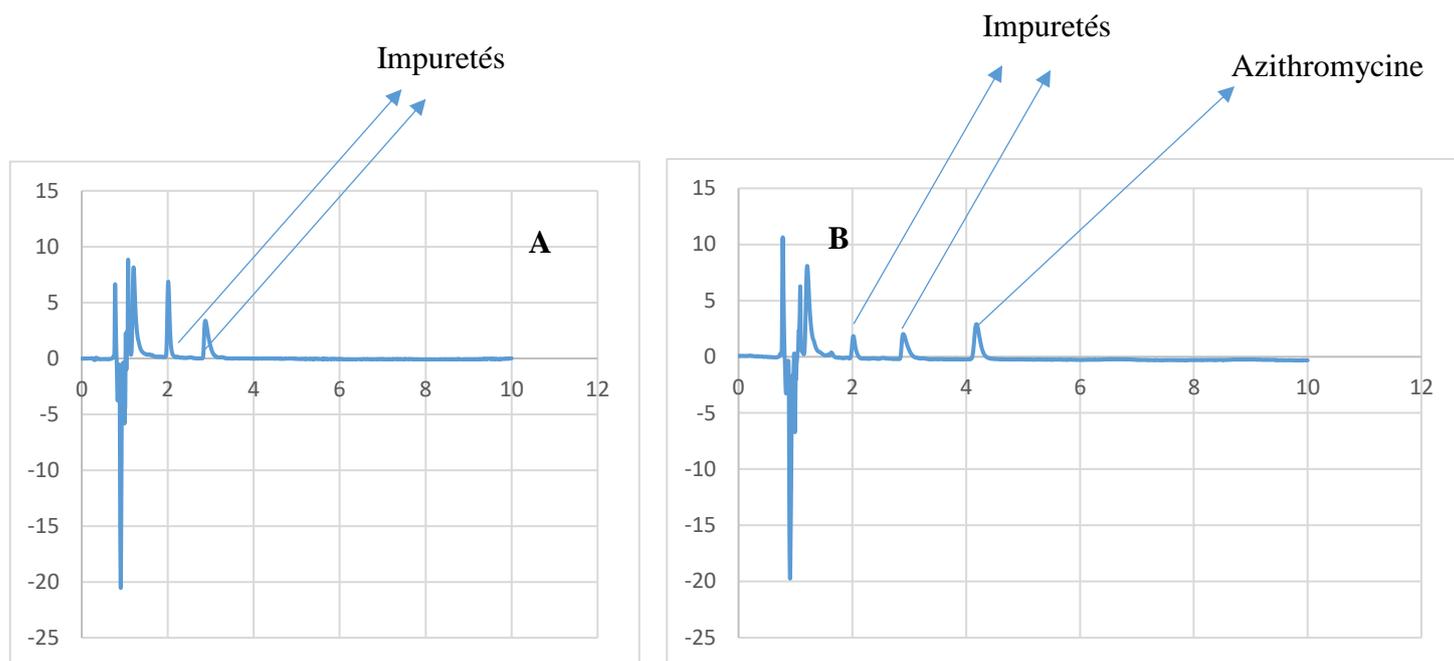
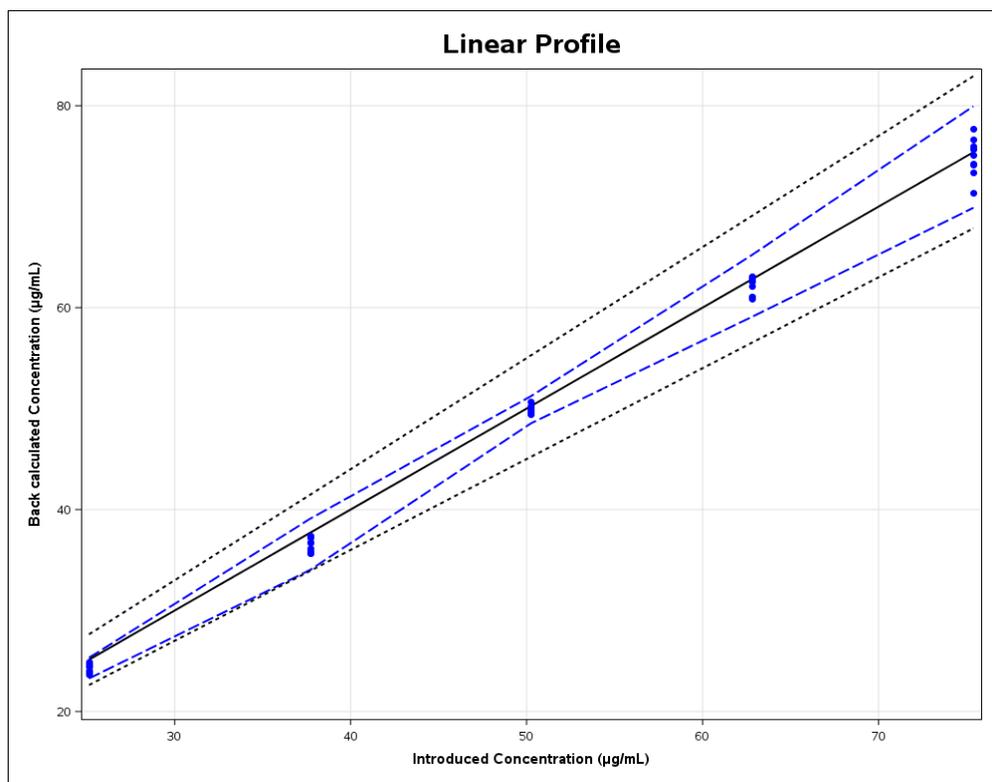
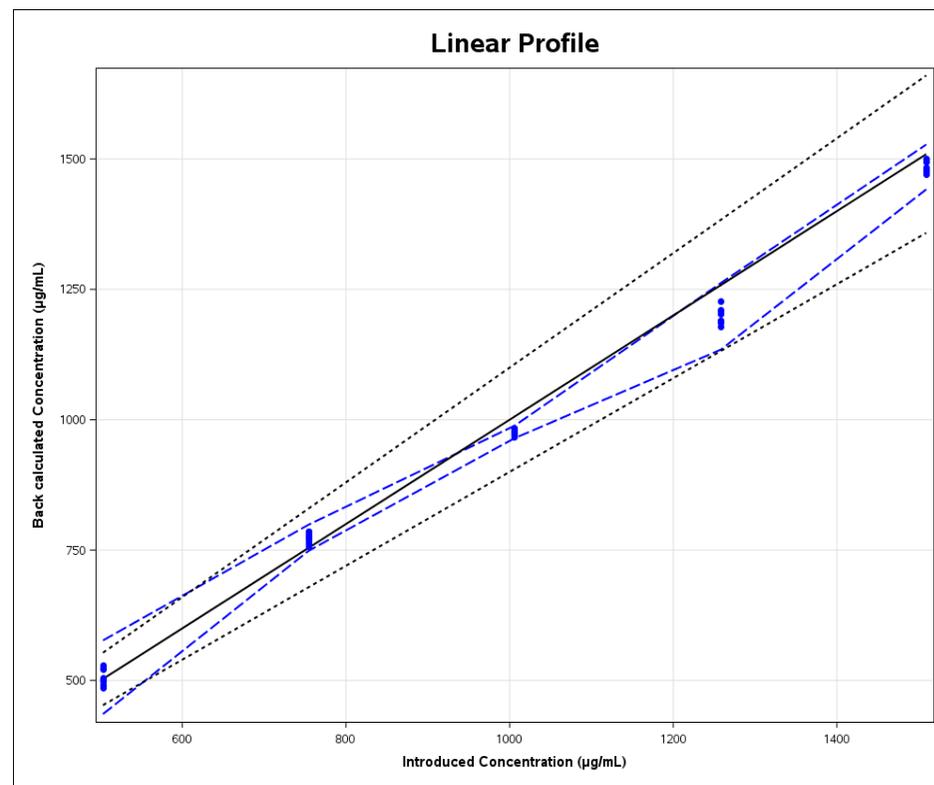


Figure 21. Spécificité de la méthode d'analyse de l'azithromycine par rapport à ses impuretés. A : Impuretés de l'azithromycine ; B : mélange azithromycine et impuretés.

b) La linéarité

La linéarité des méthodes d'analyse de l'azithromycine et du céfadroxil a été évaluée. Cette linéarité a été déterminée en évaluant la relation entre la concentration calculée (standard de validation) et la concentration introduite (standard de calibration). Les deux méthodes sont linéaires comme illustré dans la figure 22. En effet, les limites de tolérance pour chaque niveau de concentration sont comprises dans les limites d'acceptation. La pente (0,95 pour azithromycine et 1,01 pour céfadroxil) et le coefficient de corrélation ($R^2=0,9956$ pour azithromycine et 0,9970 pour céfadroxil) sont proches de 1,0000. Ces observations démontrent que les méthodes d'analyse de l'azithromycine et du céfadroxil sont bien linéaires.

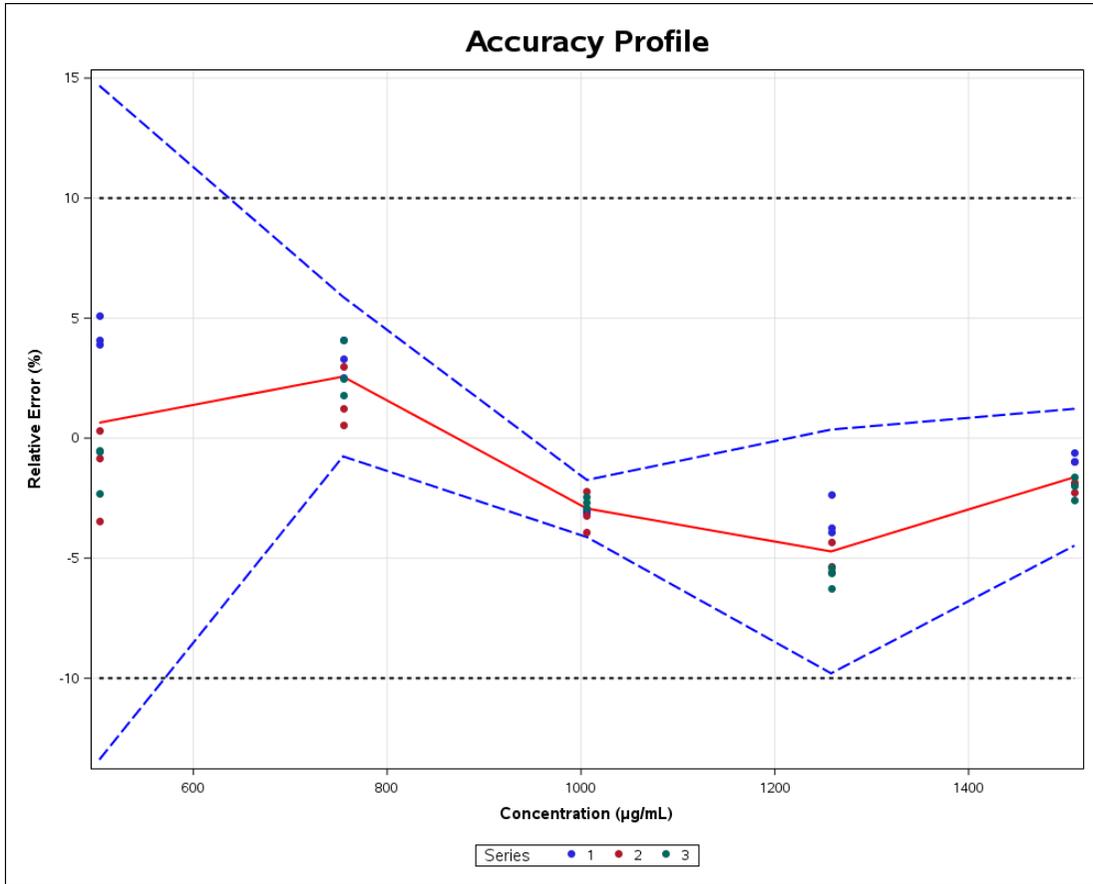
D'autres auteurs ont également démontré la linéarité des méthodes d'analyse ; il s'agit notamment de Tshilombo *et al* (2018) qui ont trouvé que les méthodes d'analyse par HPLC de l'amoxicilline et du clavulanate de potassium étaient linéaires. Quant à Tie *et al* (2018), la linéarité des méthodes d'analyse par UHPLC de l'ampicilline, amoxicilline, benzathine penicilline G, ceftriaxone, ciprofloxacine, acide clavulanique, doxycycline, ofloxacine, pénicilline G, roxithromycine et tétracycline a aussi été prouvée.

Céfadroxil**Azithromycine****Figure 22. Profils de linéarité de l'azithromycine et du céfadroxil**

c) Exactitude

L'erreur totale, c'est-à-dire la somme des erreurs systématiques (la justesse) et aléatoires (la fidélité), se trouve dans les limites d'acceptation fixées à $\pm 10\%$ selon la pharmacopée internationale, qui est parmi les pharmacopées les plus utilisées en Afrique dans l'analyse des médicaments (Pharmacopée internationale, 2018 ; Habyalimana *et al.*, 2017). En ce qui concerne le profil d'exactitude de céfadroxil, les intervalles de tolérance β -expectation se situent dans les limites d'acceptations pour tous les niveaux de concentration ciblés ; ce qui veut dire qu'il y a une probabilité de 95 % pour que chaque résultat futur se situe dans les limites acceptables avec un niveau de risque connu. S'agissant du profil d'exactitude de l'azithromycine, les bornes inférieure et supérieure du premier niveau de concentration (500 $\mu\text{g/mL}$) sont en dehors des limites d'acceptation fixées en avance. Par conséquent, cette méthode est valide pour le 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} niveau de concentration (figure 23).

Azithromycine



Céfadroxil

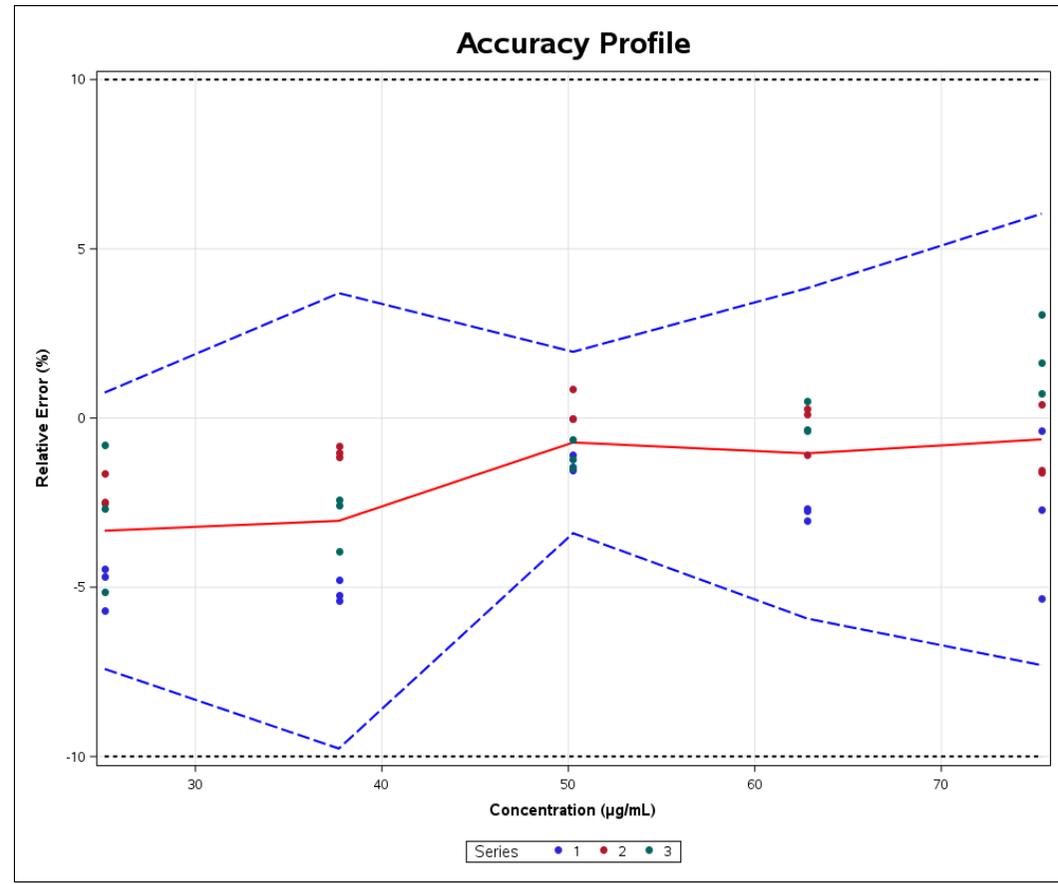


Figure 23. Profils d'exactitude de l'azithromycine et céfadroxil

c) Justesse

La justesse des deux méthodes a été évaluée en considérant la moyenne de biais observée entre la série de mesures et les concentrations ciblées. En effet, la courbe de calibration de chaque analyte a permis par la suite de calculer les concentrations du standard de validation, exprimées en termes de biais absolu ($\mu\text{g/mL}$) et biais relatif (%). Les résultats obtenus ont montré que les deux méthodes développées sont justes (tableau XXXI) car les valeurs de l'erreur systématique obtenues présentent un biais relatif qui n'est pas supérieur à 2,6 %.

Tableau XXXI. Les justesses des méthodes de l'azithromycine et du céfadroxil

	Niveau de concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Moyenne de concentration introduite ($\mu\text{g/mL}$)	Moyenne de concentration calculée ($\mu\text{g/mL}$)	Biais absolu ($\mu\text{g/mL}$)	Biais relatif (%)	Recouvrement (%)
Azithromycine						
	1,0	503,0	506,2	3,245	0,6452	100,6
	2,0	754,5	773,8	19,34	2,564	102,6
	3,0	1006	976,5	-29,49	-2,931	97,07
	4,0	1258	1198	-59,35	-4,720	95,28
	5,0	1509	1484	-24,56	-1,628	98,37
Céfadroxil						
	1,0	25,13	24,29	-0,8370	-3,331	96,67
	2,0	37,69	36,55	-1,145	-3,038	96,96
	3,0	50,25	49,89	-0,3628	-0,7220	99,28
	4,0	62,81	62,15	-0,6556	-1,044	98,96
	5,0	75,38	74,90	-0,4765	-0,6322	99,37

d) Fidélité

L'évaluation de l'erreur aléatoire montre que les deux méthodes sont fidèles. En effet, les CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire (inférieurs à 5 %) du niveau de concentration cible (100 %) (tableau XXXII) sont acceptables avec un maximum de 0,49 pour l'azithromycine et 0,94 pour le céfadroxyl.

Tableau XXXII. La fidélité des méthodes de l'azithromycine et du céfadroxyl

Niveau de concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Moyenne de concentration introduite ($\mu\text{g/mL}$)	Répétabilité (RSD%)	Fidélité intermédiaire (RSD%)
Azithromycine			
1,0	503,0	1,32	3,40
2,0	754,5	1,09	1,26
3,0	1006	0,49	0,49
4,0	1258	0,68	1,37
5,0	1509	0,34	0,74
Céfadroxil			
1,0	25,13	1,35	1,80
2,0	37,69	0,53	2,12
3,0	50,25	0,41	0,94
4,0	62,81	0,53	1,60
5,0	75,38	1,72	2,71

e) Limite de quantification et de détection

La limite de quantification étant la plus petite quantité de l'analyte pouvant être dosée dans un échantillon, dans des conditions expérimentales décrites, avec une exactitude (justesse + fidélité) définie, a été obtenue en calculant les concentrations les plus faibles et les plus élevées qui déterminent la plage de dosage où les limites inférieure et supérieure atteignent une précision suffisante (Habyalimana *et al.*, 2017). Ces plages de dosage sont comprises entre 640 $\mu\text{g/mL}$ - 1509 $\mu\text{g/mL}$ pour l'azithromycine et 25,1 $\mu\text{g/mL}$ – 75,4 $\mu\text{g/mL}$ pour le céfadroxil. Les limites de détection, qui représentent la plus petite quantité à examiner dans un échantillon, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales, sont respectivement, de 57,4 $\mu\text{g/mL}$ pour l'azithromycine et 4,87 $\mu\text{g/mL}$ pour le céfadroxil.

V.4.3. Application des méthodes HPLC validées

Les deux méthodes d'analyse que nous avons validées de l'azithromycine et de céfadroxil ont été appliquées aux échantillons prélevés localement afin de confirmer et consolider leur utilisation en routine. Nous avons eu l'opportunité d'appliquer ces méthodes sur un autre système HPLC (*Agilent Technologies 1260 Infinity II*) et une autre marque de colonne (*Kinetex C18 ; 100 x 4,6 mm id, dimension des particules, 3,5 µm*) sur des échantillons supplémentaires collectés à Kinshasa dans trois établissements de vente en gros (n=10 ; 5 pour azithromycine et 5 céfadroxil) (tableau XXXIII).

Tableau XXXIII. Résultats de dosage des échantillons à base d'azithromycine et céfadroxil

ECH	Forme pharmaceutique	Teneur déclarée (mg)	Teneur mesurée n = 3 (mg)	RSD	Teneur (%)	Conclusion
CFD001	Gélule	500	402,3	0,7	80,5	Non conforme
CFD002	Suspension	250	259,9	1,3	104,0	Conforme
CFD003	Suspension	250	254,5	0,2	101,9	Conforme
CFD004	Gélule	500	402,5	0,3	80,5	Non conforme
CFD005	Gélule	500	477,7	0,4	66,1	Non conforme
CFD006	Gélule	500	417,8	1,1	83,6	Non conforme
CFD007	Gélule	500	330,7	0,5	95,5	Conforme
CFD008	Gélule	500	545,9	0,8	109,2	Conforme
CFD009	Gélule	500	542,5	1,2	108,5	Conforme
CFD010	Comprimé	500	478,3	0,9	95,7	Conforme
CFD011	Suspension	250	247,1	0,7	98,8	Conforme
CFD012	Gélule	500	512,3	1,2	102,5	Conforme
CFD013	Gélule	500	407,2	0,5	81,4	Non conforme
CFD014	Gélule	500	467,5	1,0	93,5	Conforme
CFD015	Gélule	500	504,0	0,5	100,8	Conforme
CFD016	Gélule	500	517,2	0,7	103,4	Conforme
CFD017	Gélule	500	423,0	0,4	84,6	Non conforme
CFD018	Gélule	500	453,6	1,2	90,7	Conforme
CFD019	Gélule	500	469,3	0,8	93,9	Conforme
CFD020	Gélule	500	489,7	0,4	97,9	Conforme
CFD021	Gélule	500	511,4	0,6	102,3	Conforme
CFD022	Gélule	500	475,3	0,7	95,1	Conforme
AZT001	Comprimé	500	452,7	0,8	90,5	Conforme
AZT002	Suspension	250	253,2	1,4	101,4	Conforme
AZT003	Suspension	250	236,5	1,3	94,6	Conforme

ECH	Forme pharmaceutique	Teneur déclarée (mg)	Teneur mesurée n = 3 (mg)	RSD	Teneur (%)	Conclusion
AZT004	Comprimé	250	256,1	0,2	102,5	Conforme
AZT005	Comprimé	500	463,3	1,3	92,7	Conforme
AZT006	Comprimé	250	252,0	0,9	100,8	Conforme
AZT007	Comprimé	250	208,8	1,1	83,5	Non conforme
AZT008	Suspension	500	412,9	0,3	82,6	Non conforme
AZT009	Comprimé	500	507,4	0,6	101,5	Conforme
AZT010	Comprimé	500	473,9	1,0	94,8	Conforme
AZT011	Comprimé	500	499,2	0,9	99,8	Conforme
AZT012	Comprimé	500	487,9	0,7	97,6	Conforme
AZT013	Comprimé	250	212,2	1,4	84,9	Non conforme
AZT014	Comprimé	500	443,5	0,5	88,7	Non conforme
AZT015	Suspension	500	517,9	0,9	103,6	Conforme
AZT016	Comprimé	500	487,3	0,6	97,4	Conforme
AZT017	Comprimé	500	462,7	0,4	92,4	Conforme
AZT018	Comprimé	500	479,2	1,2	95,8	Conforme
AZT019	Comprimé	500	454,7	0,9	90,9	Conforme
AZT020	Comprimé	500	503,5	0,7	100,7	Conforme

A l'issue de l'analyse qualitative des échantillons, les résultats ont montré que le principe actif déclaré sur l'emballage de tous les échantillons d'azithromycine et céfadroxil était présent. Ceci a été confirmé en comparant le temps de rétention et le spectre UV de la substance de référence à celui de chaque échantillon.

Concernant les résultats du dosage, pour le céfadroxil, sur 22 échantillons analysés, 27 % contenaient une trop faible teneur en substance active selon les spécifications de la pharmacopée américaine (90-110 %) alors que, pour l'azithromycine, sur 20 échantillons, 20 % étaient sous-standards en termes de quantité en principe actif (90-120 %) (USP, 2018). Toutes ces non-conformités sont dues à un sous-dosage en principe actif qui était compris entre 66 et 88 %. Les échantillons hors spécifications ont été réanalysés par un autre opérateur avant de tirer une conclusion définitive sur leurs non-conformités.

Comme nous l'avons mentionné au point IV.3.3, la composition de la matrice préparée dans ce travail, se fonde sur celle couramment utilisée dans la préparation des comprimés et gélules. Nous donc avons appliqué la méthode d'analyse décrite dans la Pharmacopée Américaine sur des échantillons se présentant en suspension buvable. Nous avons toutefois essayé de vérifier si la méthode validée génère les résultats similaires à celle décrite dans la Pharmacopée

Américaine pour analyser les suspensions buvables (tableau XXXIV). La comparaison a été effectuée en utilisant la régression de Deming à partir du logiciel XLSTAT. En effet, cette régression permet de comparer deux méthodes de mesure, elle suppose que l'erreur de mesure est présente aussi bien dans X que dans Y. Les graphiques de régression de Deming (figure 24 et 25) illustrent bien qu'il n'y a pas de différence significative entre les méthodes validées et officielles. En effet, la valeur de la constante est de -12,0 pour l'azithromycine et 24,1 pour céfadroxil avec un intervalle de confiance qui comprend le 0. Comme l'intervalle de confiance comprend le 0 pour les méthodes de l'azithromycine et céfadroxil, l'hypothèse de différence systématique nulle ne peut pas être rejetée. Le même constat est fait également avec le coefficient de pente qui est de 1,12 pour azithromycine et 0,78 pour céfadroxil avec un intervalle de confiance qui inclut la valeur de 1 ; ce qui veut dire qu'il n'y a pas de différence proportionnelle entre les deux méthodes.

Tableau XXXIV. Comparaison des résultats de dosage des Suspensions buvables entre les méthodes validées et référentielles

ECH	Forme galénique	Méthodes validées (%)	Méthodes officielles (%)
AZT001	Susp buv	90,53	91,39
AZT002	Susp buv	101,35	99,69
AZT003	Susp buv	94,58	96,27
AZT015	Susp buv	103,57	102,98
AZT008	Susp buv	82,58	83,69
CFD011	Susp buv	98,85	96,36
CFD003	Susp buv	101,89	99,89
CFD002	Susp buv	103,96	102,97

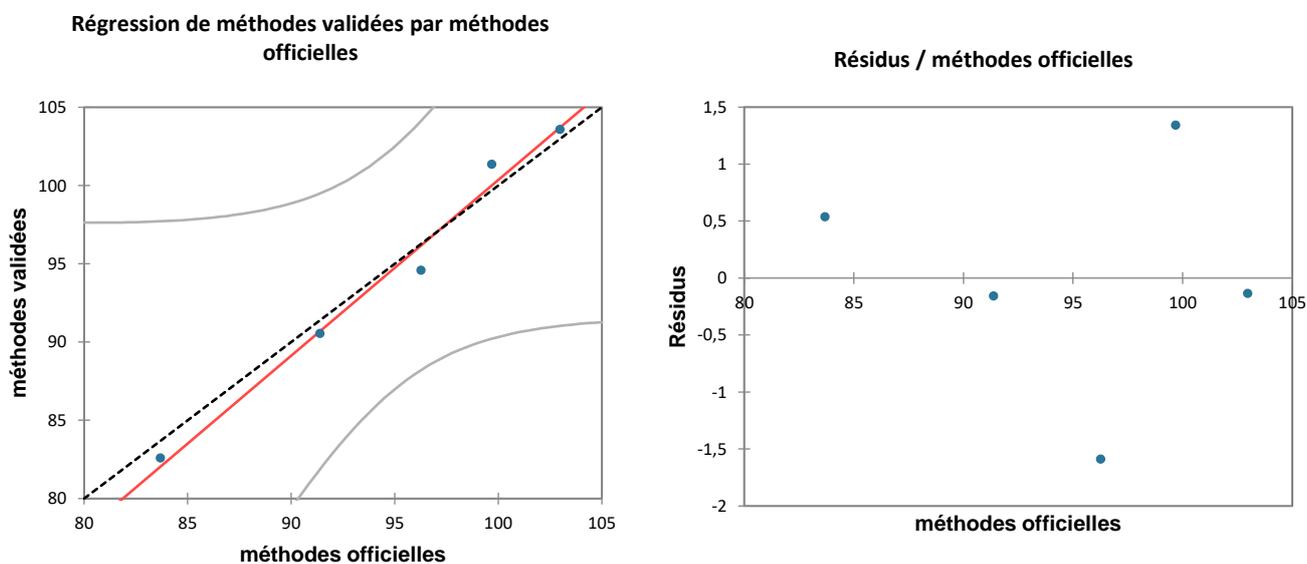


Figure 24. Comparaison des résultats de l'azithromycine en Suspension buvable obtenus par les méthodes validée et officielle HPLC à partir de la regression de Deming

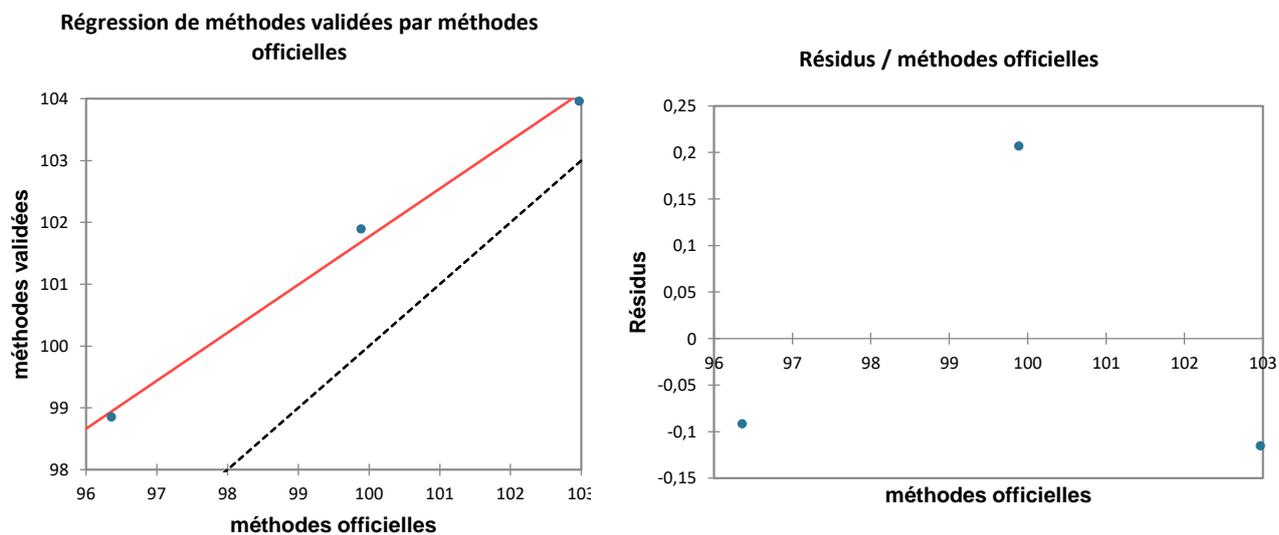


Figure 25. Comparaison des résultats de céfadroxil en Suspension buvable obtenus par les méthodes validée et officielle HPLC à partir de la regression de Deming

V.5. DÉVELOPPEMENT, VALIDATION ET APPLICATION DES MÉTHODES NON SEPARATIVES

V.5.1. Développement des méthodes non séparatives

Comme nous l'avons mentionné au point IV.3.2.2.1, trois antibiotiques (céfixime, érythromycine et tétracycline) sont concernés par le développement des méthodes d'analyse basées sur la spectrophotométrie UV-Vis. Une série d'expérimentations a permis de déterminer :

- La concentration cible ;
- La longueur d'onde et ;
- Le diluant

Le tableau XXXV reprend les réponses analytiques obtenues avec ces trois facteurs.

Tableau XXXV. Réponses analytiques en fonction du milieu, de la longueur d'onde et de la concentration

Principe actif	Milieu	Longueur d'onde (nm)	Concentration (µg/mL)	Réponse analytique
Céfixime	Eau	254	20	0,136
			30	0,212
			40	0,317
		220	20	0,255
			30	0,382
			40	0,506
		257	20	0,144
			30	0,212
			40	0,297
	HCl 0,1N	254	20	0,188
			30	0,275
			40	0,380
		220	20	0,220
			30	0,303
			40	0,413
		257	20	0,166
			30	0,254
			40	0,327
NaOH 0,1N	254	20	0,690	
		30	1,061	
		40	1,321	
	220	20	0,974	
		30	1,319	
		40	1,933	
	257	20	0,608	
		30	0,964	
		40	1,265	
Tétracycline	Eau	356	10	0,448
			15	0,613
			20	0,849
			20	0,849
			10	0,399

Tableau XXXV. Réponses analytiques en fonction du milieu, de la longueur d'onde et de la concentration

Principe actif	Milieu	Longueur d'onde (nm)	Concentration (µg/mL)	Réponse analytique	
Erythromycine	HCl 0,1N	270	15	0,601	
			20	0,800	
			10	0,313	
		356	15	0,499	
			20	0,688	
			10	0,599	
		276	15	0,839	
			20	1,188	
			10	0,429	
		NaOH 0,1N	270	15	0,651
				20	0,827
				10	0,409
	356		15	0,615	
			20	0,769	
			10	0,362	
	NaOH 0,1N	276	15	0,488	
			20	0,695	
			10	0,292	
		270	15	0,461	
			20	0,601	
			10	0,152	
		NaOH 0,1N	215	15	0,245
				20	0,329
				500	0,071
			305	1000	0,124
				1500	0,201
				500	0,054
	384		1000	0,111	
			1500	0,172	
			500	0,008	
	HCl 0,1N		215	1000	0,011
				1500	0,007
				500	0,133
		305	1000	0,258	
			1500	0,392	
			500	0,048	
Méthanol	215	1000	0,075		
		1500	0,125		
		500	0,003		
	305	1000	0,004		
		1500	0,005		
		500	0,538		
Méthanol	384	1000	0,979		
		1500	1,587		
		500	0,148		
	215	1000	0,334		
		1500	0,461		
		500	0,101		
		1000	0,230		
		1500	0,314		

Les conditions analytiques ont été retenues en considérant (i) la linéarité en rapport avec la fonction de réponse tout en prenant en compte le coefficient de détermination (R^2) qui devrait être le plus proche possible de un (ii) l'absorption dans l'UV de l'analyte et (iii) la réponse analytique qui devrait davantage se rapprocher du milieu de l'intervalle de Beer-Lambert (0.2 et 0.8).

a) Méthode d'analyse de céfixime

Les réponses analytiques obtenues ont montré qu'à 220 nm, l'absorption dans l'ultraviolet était supérieure à celles obtenues à 254 et 257 nm, quel que soit le milieu dans lequel il a été préparé. Parallèlement, le céfixime dissous dans le NaOH 0,1N a présenté une bonne absorption dans l'ultraviolet que lorsqu'il était dissous puis dilué dans l'HCl 0,1N ou dans l'eau milli Q (Tableau XXXV). Dey *et al.*, (2012) et Baghel *et al* (2015) ont développé la méthode d'analyse du céfixime en utilisant respectivement HCl 0,1N et NaOH 0,1N. Nous avons retenu l'eau comme le diluant pour notre étude. En plus, les réponses analytiques obtenues en préparant le céfixime dans le NaOH 0,1N n'ont pas permis d'obtenir une meilleure linéarité et ne se situaient pas au milieu de l'intervalle 0,2 – 0,8. Une bonne linéarité a été obtenue avec le céfixime préparé dans l'eau milli Q lorsque la mesure au spectrophotomètre était effectuée à 220 nm. Ainsi, pour l'exécution de la méthode d'analyse de céfixime, nous avons retenu l'eau comme diluant, la longueur d'onde à 220 nm et 40 µg/mL comme étant la concentration cible.

Dans leur étude, Dey *et al* (2012) avaient trouvé une absorption maximale de céfixime à 283 nm en utilisant une solution d'HCl 0,1N comme diluant, la concentration cible considérée dans l'étude était de 12 µg/mL. De leur part, Baghel *et al* (2012) avait dissous puis dilué le céfixime dans le NaOH 0,1N pour obtenir une concentration cible à 15 µg/mL et la mesure au spectrophotomètre était effectuée à 237 nm.

b) Méthode d'analyse de l'érythromycine

S'agissant d'érythromycine, l'utilisation de NaOH 0,1N et HCl 0,1N comme diluant a donné des faibles valeurs d'absorbance (0,003 à 0,201) à 305 et 384 nm et le coefficient de corrélation était inférieur à 0,99. Par contre, dans le méthanol une bonne absorption dans l'ultraviolet était observée à 215 nm et une bonne linéarité avec un coefficient de corrélation proche de un (0,9916). La longueur d'onde à 215 nm, la concentration cible à 500 µg/mL et le méthanol ont donc été retenus pour exécuter la méthode spectrophotométrique UV visible d'érythromycine. En mettant au point leur méthode de dosage d'érythromycine par spectrophotométrie UV visible, Rattanapoltaveechai *et al* (2007) avaient utilisé un mélange de méthanol : tampon

phosphate (1÷1) comme diluant, la concentration cible était à 12 mg/mL et la mesure au spectrophotomètre s'était réalisé à 285 nm et 300 nm. De leur part Wankhade *et al* (2012) avait dissout puis dilué l'érythromycine dans un mélange d'acétonitrile : eau (1÷1), la concentration cible était 15 µg/mL et la longueur d'onde était fixée à 236 nm.

c) Méthode d'analyse de tétracycline

Pour la méthode d'analyse de tétracycline, nous avons retenu l'eau comme diluant, la longueur d'onde 270 nm et la concentration cible à 10 µg/mL. Peu d'études se sont penchées sur le développement des méthodes spectrophotométriques UV visible de tétracycline, nous pouvons évoquer l'étude menée par Saha *et al* (1990) qui avaient développé une méthode spectrophotométrique de tétracycline en utilisant une solution d'acétate d'uranyle comme diluant, l'absorption maximale était obtenue à 414, 406, 419, 405 et 402 nm.

V.5.2. Validation des méthodes non séparatives

Les méthodes d'analyse spectrophotométriques développées de céfixime, de l'érythromycine et de la tétracycline ont été par la suite validées selon les directives de l'ICH Q₂ (R₁). La stratégie de l'erreur totale représentée par le profil d'exactitude a été utilisée comme outil décisionnel pour la validation. Les critères (spécificité, justesse, fidélité, exactitude, linéarité, limite de détection et de quantification et intervalle de dosage) évalués dans la validation des méthodes HPLC ont été les mêmes que ceux déterminés dans la validation des méthodes spectrophotométriques.

a) Spécificité

Concernant la spécificité de la méthode d'analyse de la tétracycline et de l'érythromycine nous n'avons pas observé d'interférence de la matrice avec les analytes à la longueur d'onde retenue. La moyenne des valeurs d'absorbance obtenues avec les solutions standards et standard+matrice ont montré que, statistiquement, il n'y avait pas une différence significative car la valeur de ($t_{\text{calculé}} < t_{\text{table}}$) (tableau XXXVI). Ces observations ont démontré que ces deux méthodes sont bien spécifiques.

En revanche, s'agissant du céfixime, nous avons noté un effet de matrice important. En effet, les réponses analytiques ont considérablement augmenté en comparaison avec la solution qui contenait le standard de céfixime seul et celle qui contenait le céfixime+matrice. Aussi, la valeur de $t_{\text{calculé}}$ était largement supérieure au t_{table} . L'effet de matrice serait dû à la présence dans la matrice de polyvinylpyrone qui possède des groupements chromophores ayant un pouvoir

d'absorber la lumière dans l'ultraviolet. La méthode d'analyse de céfixime n'a donc pas été considérée comme étant spécifique par rapport à la matrice utilisée dans ce travail.

Tableau XXXVI. Comparaison des moyennes des absorbances entre les solutions sans et avec matrice

Principe actif	Concentration (micro/mL)	Solution sans matrice (n=3)	Solution avec matrice (n=3)	t _{calculé}	t _{table}
Tétracycline	15	0,498± 0,001	0,500 ± 0,0006	1,093	2,776
Erythromycine	500	0,561± 0,01	0,563 ± 0,02	2,440	2,776
Céfixime	40	0,510 ± 0,02	0,586 ± 0,01	21,026	2,776

b) Justesse

Etant donné que la justesse d'une méthode illustre la moyenne des biais entre la valeur moyenne issue des plusieurs mesures et la vraie valeur (valeur de référence). Nous avons exprimé les résultats de la justesse de trois méthodes en termes de biais relatif (%) et biais absolu (µg/mL). La justesse des méthodes développées de tétracycline et de l'érythromycine a été démontrée à tous les niveaux de concentration car le biais relatif de deux antibiotiques était inférieur à 3 % et les recouvrements de tous les niveaux de concentration étaient supérieurs à 95 %, confirmant ainsi que les deux méthodes sont justes (tableau XXXVII). Par contre, pour la méthode développée de céfixime, hormis le troisième, quatrième et cinquième niveau de concentration qui ont donné un biais relatif de moins de 15 %, le deux autres niveaux de concentration (premier, deuxième) ont donné un biais relatif supérieur à 15 % et le premier niveau a également présenté un recouvrement supérieur à 120 %, ce qui est supérieur aux critères d'acceptation (≤ 15 % pour le biais relatif et 70 à 120 % pour le recouvrement) préconisés par FDA (*Food Drug Administration*) (Bouadibi, 2014). Les constats faits sur la méthode de céfixime seraient dû à un effet de matrice qui était de l'ordre de 10 à 20 % en termes de justesse. A cet effet, la méthode développée de céfixime n'a pas été considéré comme étant juste.

Tableau XXXVII. Justesse de méthode d'érythromycine, céfixime et tétracycline

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyenne de concentration introduite (µg/mL)	Moyenne de concentration calculée (µg/mL)	Biais absolu (µg/mL)	Biais relatif (%)	Recouvrement (%)
Erythromycine					
1,0	251,3	247,4	-3,876	-1,543	98,46
2,0	376,9	375,7	-1,143	-0,3032	99,70
3,0	502,5	499,8	-2,701	-0,5376	99,46
4,0	628,1	617,5	-10,61	-1,689	98,31
5,0	753,8	747,7	-6,093	-0,8084	99,19
Céfixime					
1,0	20,30	25,10	4,799	23,64	123,6
2,0	30,45	35,59	5,142	16,89	116,9

Tableau XXXVII. Justesse de méthode d'érythromycine, céfixime et tétracycline

Niveau de concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Moyenne de concentration introduite ($\mu\text{g/mL}$)	Moyenne de concentration calculée ($\mu\text{g/mL}$)	Biais absolu ($\mu\text{g/mL}$)	Biais relatif (%)	Recouvrement (%)
3,0	40,60	44,62	4,017	9,894	109,9
4,0	50,75	56,13	5,379	10,60	110,6
5,0	60,90	68,77	7,871	12,93	112,9
Tétracycline					
1,0	5,025	5,157	0,1324	2,635	102,6
2,0	7,538	7,741	0,2035	2,699	102,7
3,0	10,05	10,17	0,1151	1,146	101,1
4,0	12,56	12,63	0,06867	0,5466	100,5
5,0	15,08	14,44	-0,6350	-4,213	95,79

c) Fidélité

La fidélité de la méthode qui renseigne sur les erreurs aléatoires a été évaluée en déterminant le coefficient de variation de répétabilité (CV de répétabilité) et de fidélité intermédiaire (CV de fidélité intermédiaire) à tous les niveaux de concentration. Comme mentionné dans le tableau XXXVIII les trois méthodes étaient fidèles car les CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire étaient respectivement inférieurs à 2,98 % et 4,97 %.

Tableau XXXVIII. La fidélité de la méthode d'érythromycine, céfixime et tétracycline

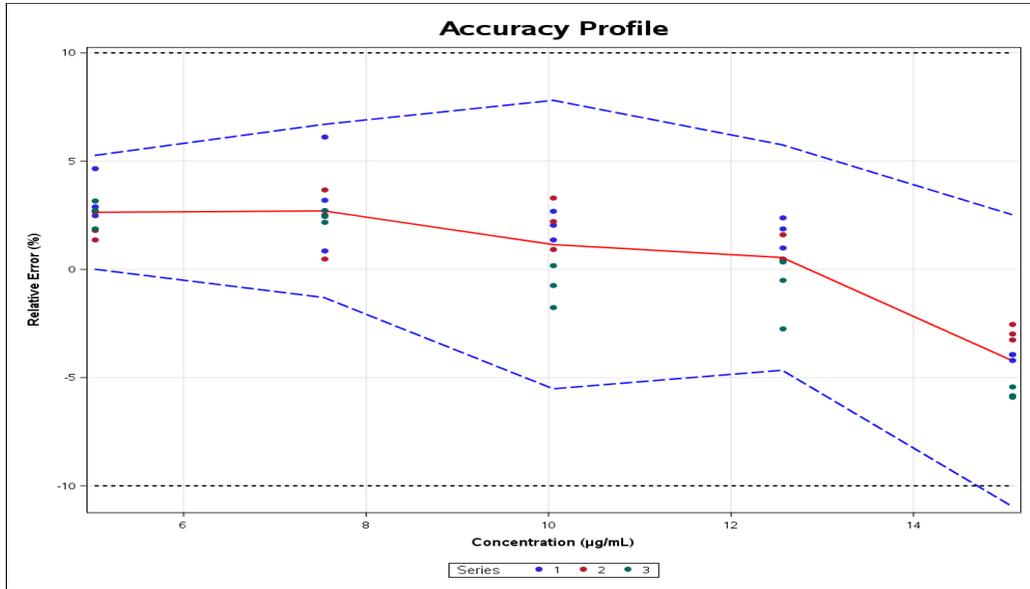
Niveau de concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Moyenne de concentration introduite ($\mu\text{g/mL}$)	CV de répétabilité (%)	CV de fidélité intermédiaire (%)
Erithromycine			
1.0	251.3	1.856	4.965
2.0	376.9	2.325	4.051
3.0	502.5	0.8299	0.9034
4.0	628.1	1.521	2.070
5.0	753.8	0.7623	0.7984
Céfixime			
1.0	20.30	2.975	2.975
2.0	30.45	1.084	2.558
3.0	40.60	0.8368	2.481
4.0	50.75	1.030	2.875
5.0	60.90	1.554	3.549
Tétracycline			
1.0	5.025	0.8557	0.9922
2.0	7.538	1.635	1.635
3.0	10.05	0.9625	1.837
4.0	12.56	1.078	1.640
5.0	15.08	0.2688	1.422

d) Exactitude

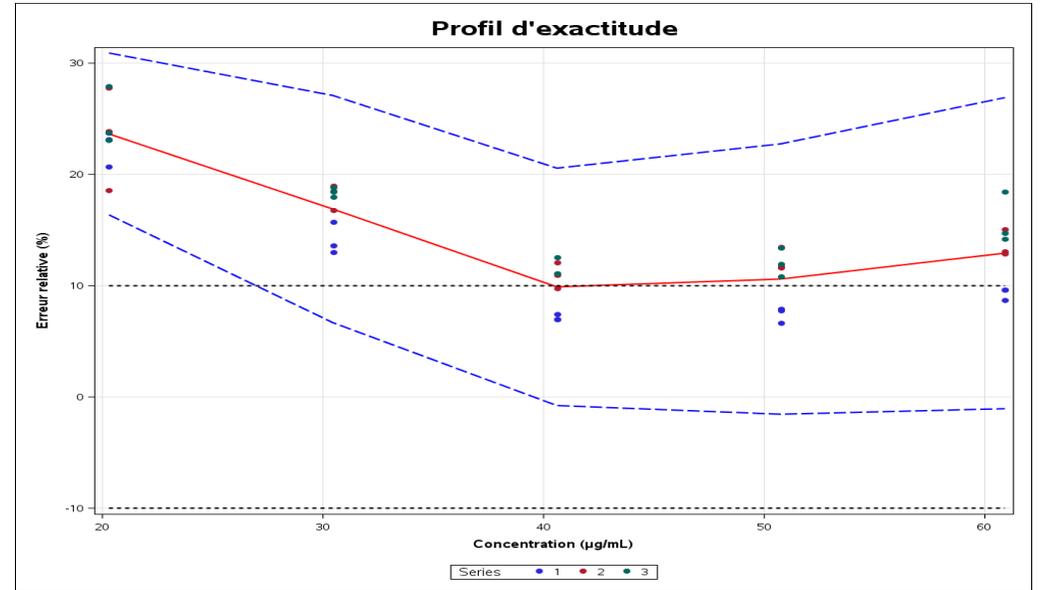
L'exactitude des méthodes spectrophotométriques UV-Vis développées de tétracycline, érythromycine et céfixime a été évaluée grâce au profil d'exactitude qui nous a permis de décider de la capacité de la méthode à quantifier le plus exactement possible les analytes étudiés. Comme illustré dans la figure 27, la méthode spectrophotométrique UV-Visible de tétracycline est valide sauf que la borne inférieure sur le dernier niveau de concentration (15 $\mu\text{g/mL}$) a un peu débordé les règles d'acceptations qui ont été fixées ($\pm 10\%$); ce qui veut dire que nous avons atteint la limite de quantification à ce niveau. Nous avons donc conclu que cette méthode est valide pour le premier, deuxième, troisième et quatrième niveau de concentration. Par ailleurs, concernant la méthode d'analyse de l'érythromycine, seuls les troisième, quatrième et cinquième niveau de concentration sont valides alors que le premier et le deuxième niveau ne les sont pas car l'intervalle de prédiction de ces deux premiers niveaux sont en dehors des limites fixées.

En revanche, la méthode d'analyse de céfixime n'est pas valide car sur tout l'intervalle de dosage (20 à 60 $\mu\text{g/mL}$) aucun niveau de concentration n'est inclus dans les limites d'acceptation fixées tel qu'illustré dans la figure 26.

Tétracycline



Céfixime



Erythromycine

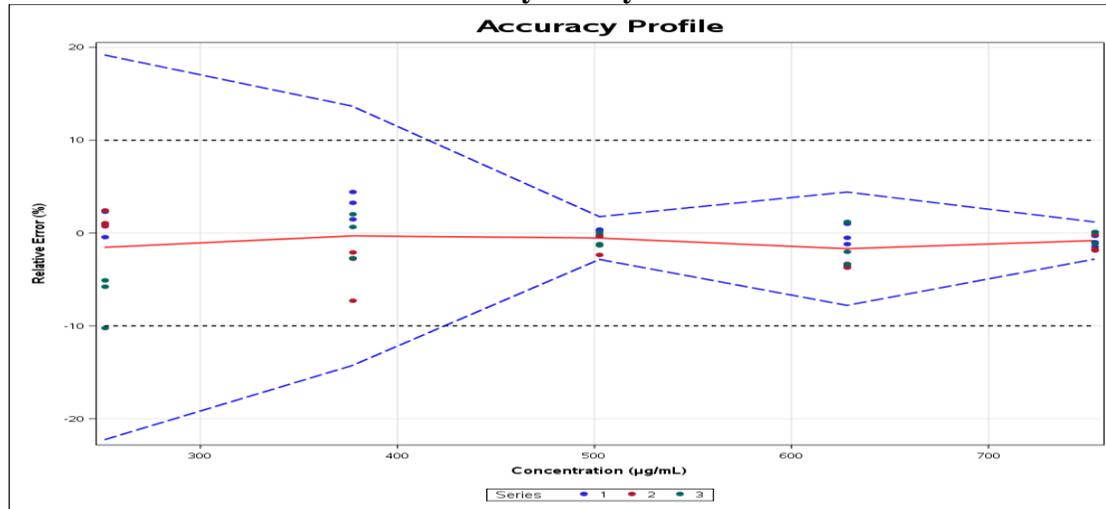


Figure 26. Profils d'exactitude de : tétracycline, céfixime et érythromycine

e) Linéarité

Dans le but de déterminer la capacité d'une méthode à fournir des résultats qui sont directement proportionnels aux concentrations, nous avons évalué la linéarité des résultats de méthodes spectrophotométriques développées de tétracycline et d'érythromycine. La figure 27 montre que les limites de tolérance pour chaque niveau de concentration sont comprises dans les limites d'acceptation confirmant ainsi donc la linéarité de ces deux méthodes spectrophotométriques UV-Vis. En considérant les données d'une équation linéaire (le coefficient de détermination et la pente), nous avons trouvé que la relation entre les résultats et les concentrations introduites étaient bien linéaires pour les méthodes développées de tétracycline et d'érythromycine. En effet, la valeur de coefficient de détermination (R^2 : 0,9945 pour tétracycline et 0,9968 pour érythromycine) et de la pente (0,93 pour tétracycline et 0,99 pour érythromycine) étaient proches de un et la valeur de la somme des carrés était respectivement de 2,722 et 4480 pour tétracycline et érythromycine. Les limites de quantification inférieure et supérieure étaient de 5,03 μ g/mL et 14,70 μ g/mL pour tétracycline et 423,90 μ g/mL et 753,80 pour érythromycine. La limite de détection était respectivement de 0,2230 μ g/mL et 11,99 μ g/mL pour tétracycline et érythromycine.

Tétracycline

Erythromycine

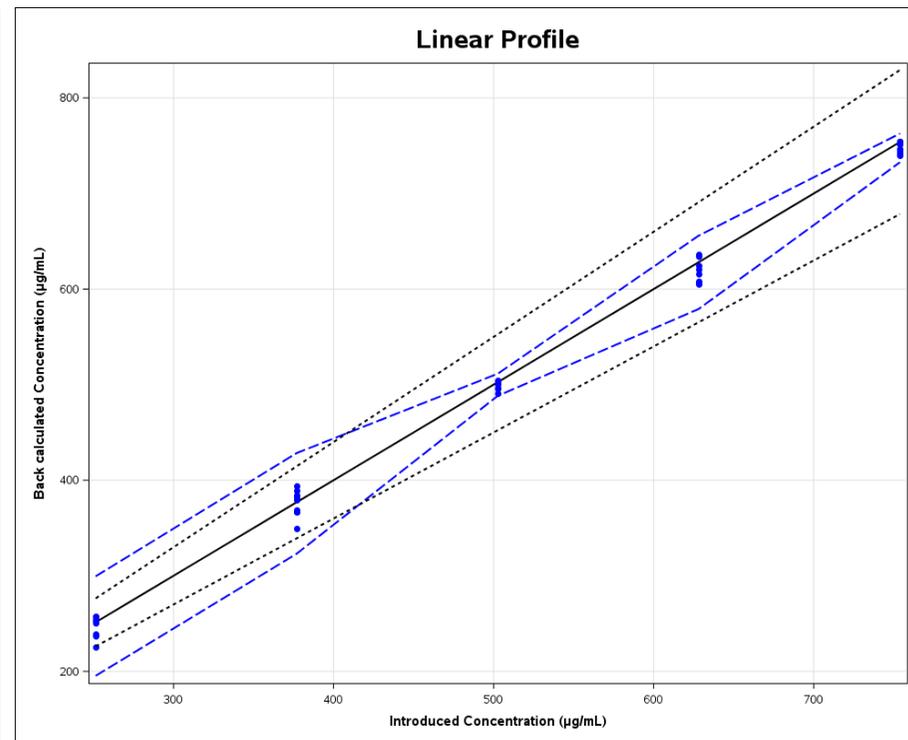
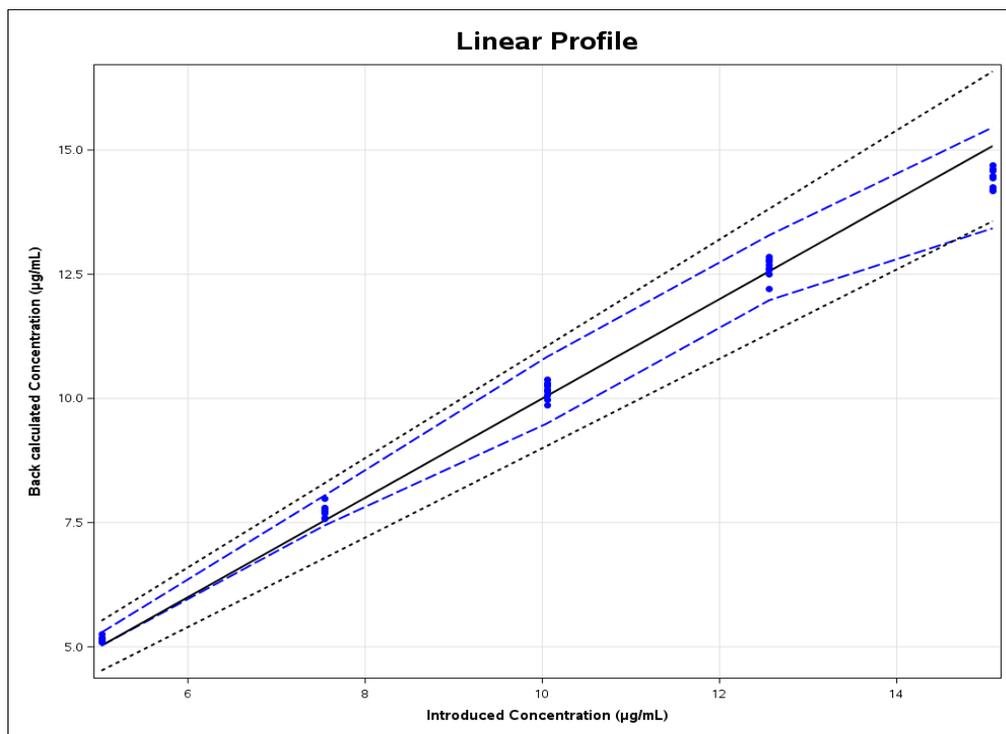


Figure 27. Profils de linéarité de tétracycline et de l'érythromycine

V.5.3. Application de méthode non séparatives (utilisation en routine)

Les méthodes d'analyse validées de tétracycline et érythromycine ont été appliquées sur des échantillons (tableau XXXIX).

Par ailleurs, étant donné que les résultats de la validation avaient montré que la méthode d'analyse de céfixime n'était pas valide, nous avons recouru à la méthode des ajouts-dosés pour analyser les échantillons à base de céfixime. En plus, les résultats de dosage obtenus des échantillons de céfixime ont été comparés avec ceux obtenus en appliquant la méthode HPLC décrite dans la Pharmacopée Américaine (tableau XL). Comme mentionné ci-haut, cette comparaison a été réalisée en utilisant la régression de Deming générée à partir du logiciel XLSTAT. Le graphique de régression de Deming (figure 28) a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les méthodes proposées et officielles car la valeur de la constante est de -3,08 avec un intervalle de confiance (-9,80 - 3,645) qui comprend le 0. Le coefficient de pente est de 1,030 avec un intervalle de confiance incluant le 1 (0,96 – 1,10).

Sur 67 échantillons analysés, 21 % étaient sous-standards selon les spécifications de la pharmacopée américaine : 90 – 110 % pour céfixime, 90 - 125 % pour tétracycline et 90 – 120 % pour chloramphénicol et érythromycine). Tous les échantillons hors spécifications (n=14) étaient sous-dosés en termes de teneur en principe actif. La teneur des échantillons sous-dosés variait entre 63 et 89 %. Les échantillons de l'érythromycine en suspension buvable ont été aussi analysés en utilisant la méthode HPLC décrite dans la Pharmacopée Américaine (tableau XLI). La régression de Deming montre dans la figure 29 qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux méthodes.

Pour céfixime sur 36 échantillons analysés, 12 étaient sous-dosés en termes de teneur en principe actif. En revanche, les échantillons de céfixime analysés par spectrophotométrie UV visible par Ejike *et al* (2013) au Nigéria (n=12) et Ramadan *et al* (2013) en Syrie (n=6), étaient tous conformes selon les spécifications de la pharmacopée américaine. De leur part, Keskar *et Jugade* (2015) avaient trouvé trois échantillons (n=6) de céfixime hors spécifications (sous-dosage). Concernant l'érythromycine, sur 17 échantillons analysés dans ce travail, deux contenaient une quantité inférieure en principe actif. En Egypte, Hasbi *et al* (2011), avaient trouvé que 3 échantillons d'érythromycine sur 11, étaient sous-dosés. Il convient de souligner que le chloramphénicol et la tétracycline n'ont présenté aucune non-conformité dans ce travail.

Tableau XXXIX. Résultats de dosage des échantillons à base de chloramphénicol, érythromycine et tétracycline obtenus par spectrophotométrie UV-Vis

ECH	Forme galénique	Teneur déclarée (mg)	Teneur mesurée (mg)	RSD	% en PA	Conclusion
CHL001	Gélule	250	242,2	0,2	96,9	Conforme
CHL002	Gélule	250	263,0	0,1	105,2	Conforme
CHL003	Gélule	250	225,8	0,3	90,3	Conforme
CHL004	Gélule	250	264,6	0,1	105,9	Conforme
CHL005	Gélule	250	254,1	0,7	101,6	Conforme
CHL006	Gélule	250	272,9	0,6	109,2	Conforme
CHL007	Gélule	250	240,6	0,2	96,2	Conforme
CHL008	Gélule	250	265,5	0,1	106,2	Conforme
CHL009	Gélule	250	233,3	0,6	93,3	Conforme
TRC001	Gélule	250	228,6	0,4	91,5	Conforme
TRC002	Gélule	250	230,9	0,7	92,4	Conforme
TRC003	Gélule	250	256,7	0,6	102,7	Conforme
TRC004	Gélule	250	268,1	0,5	107,2	Conforme
TRC005	Gélule	250	225,7	0,3	90,3	Conforme
TRC006	Gélule	250	247,4	0,2	98,94	Conforme
TRC007	Gélule	250	239,6	0,3	95,8	Conforme
TRC008	Gélule	250	254,1	0,8	101,6	Conforme
ERH003	Gélule	500	521,9	0,4	104,4	Conforme
ERH004	Gélule	250	255,9	0,6	102,4	Conforme
ERH005	Gélule	500	438,7	0,2	87,8	Non conforme
ERH006	Gélule	250	251,6	0,8	100,6	Conforme
ERH007	Gélule	500	470,1	0,4	94,0	Conforme
ERH008	Gélule	250	241,9	0,3	96,8	Conforme
ERH009	Gélule	250	254,3	0,4	101,2	Conforme
ERH010	Gélule	500	455,8	0,2	91,2	Conforme
ERH011	Gélule	250	238,9	0,3	95,6	Conforme
ERH001	Susp buv	250	270,3	0,4	110,0	Conforme
ERH002	Susp buv	250	265,6	0,5	106,3	Conforme
ERH012	Susp buv	250	253,2	0,7	101,3	Conforme
ERH013	Susp buv	125	256,0	0,2	102,4	Conforme
ERH014	Susp buv	250	249,8	0,1	99,9	Conforme
ERH015	Susp buv	125	258,3	0,9	103,3	Conforme
ERH016	Comprimé	250	261,3	0,9	104,5	Conforme
ERH017	Susp buv	125	212,5	0,9	85,0	Non conforme

Tableau XL. Résultats de dosage des échantillons de céfixime en utilisant la méthode des ajouts-dosés

ECH	Forme galénique	Teneur déclarée (mg)	Teneur mesurée (mg)	RSD	% en PA	% méthode officielle	Conclusion
CFX001	Comprimé	200	218,3	0,8	109,1	108,2	Conforme
CFX002	Comprimé	200	125,1	0,9	62,5	65,9	Non conforme
CFX003	Comprimé	100	108,4	1,0	108,4	107,5	Conforme
CFX004	Comprimé	200	186,9	0,4	93,5	93,0	Conforme
CFX005	Comprimé	200	167,8	0,6	83,9	85,5	Non conforme
CFX006	Comprimé	200	185,3	1,1	80,9	80,7	Non conforme
CFX007	Comprimé	200	183,7	0,3	91,8	94,5	Conforme
CFX008	Comprimé	200	161,7	0,5	92,7	94,4	Conforme
CFX009	Comprimé	200	169,2	0,7	84,6	82,4	Non conforme
CFX001	Comprimé	200	218,4	0,3	109,2	108,7	Conforme
CFX011	Comprimé	200	206,1	1,3	103,1	103,9	Conforme
CFX012	Comprimé	200	214,9	0,1	107,5	106,5	Conforme
CFX013	Comprimé	200	208,7	0,7	104,3	106,4	Conforme
CFX014	Comprimé	200	155,6	0,5	77,8	76,8	Non conforme
CFX015	Comprimé	100	82,7	0,7	82,7	81,2	Non conforme
CFX016	Comprimé	200	190,1	0,3	95,1	95,9	Conforme
CFX017	Comprimé	200	162,7	0,2	81,3	83,9	Non conforme
CFX018	Comprimé	200	187,8	1,4	93,9	93,8	Conforme
CFX019	Comprimé	200	191,4	0,7	95,7	97,0	Conforme
CFX020	Comprimé	200	171,9	0,3	85,9	82,9	Non conforme
CFX021	Comprimé	200	174,9	0,6	87,5	88,6	Non conforme
CFX022	Comprimé	200	177,5	0,4	88,6	87,2	Non conforme
CFX023	Comprimé	200	191,1	0,3	95,5	96,6	Conforme
CFX024	Comprimé	200	190,9	0,4	95,5	93,8	Conforme
CFX025	Comprimé	200	184,4	1,2	92,2	92,3	Conforme
CFX026	Susp buv	20	171,1	1,1	85,6	87,8	Non conforme
CFX027	Susp buv	20	187,1	0,9	93,6	94,8	Conforme
CFX028	Susp buv	20	182,5	0,7	91,3	91,8	Conforme
CFX029	Susp buv	20	184,4	0,3	92,2	93,4	Conforme
CFX030	Susp buv	20	187,4	0,6	93,7	94,4	Conforme
CFX031	Susp buv	20	207,5	0,4	103,7	101,8	Conforme
CFX032	Susp buv	20	202,8	0,5	101,4	103,1	Conforme
CFX033	Susp buv	20	220,4	1,0	110,2	108,6	Conforme
CFX034	Susp buv	20	160,1	0,6	80,1	80,4	Non conforme
CFX035	Susp buv	20	190,2	0,2	95,1	94,3	Conforme
CFX036	Susp buv	20	190,6	0,3	95,3	95,9	Conforme

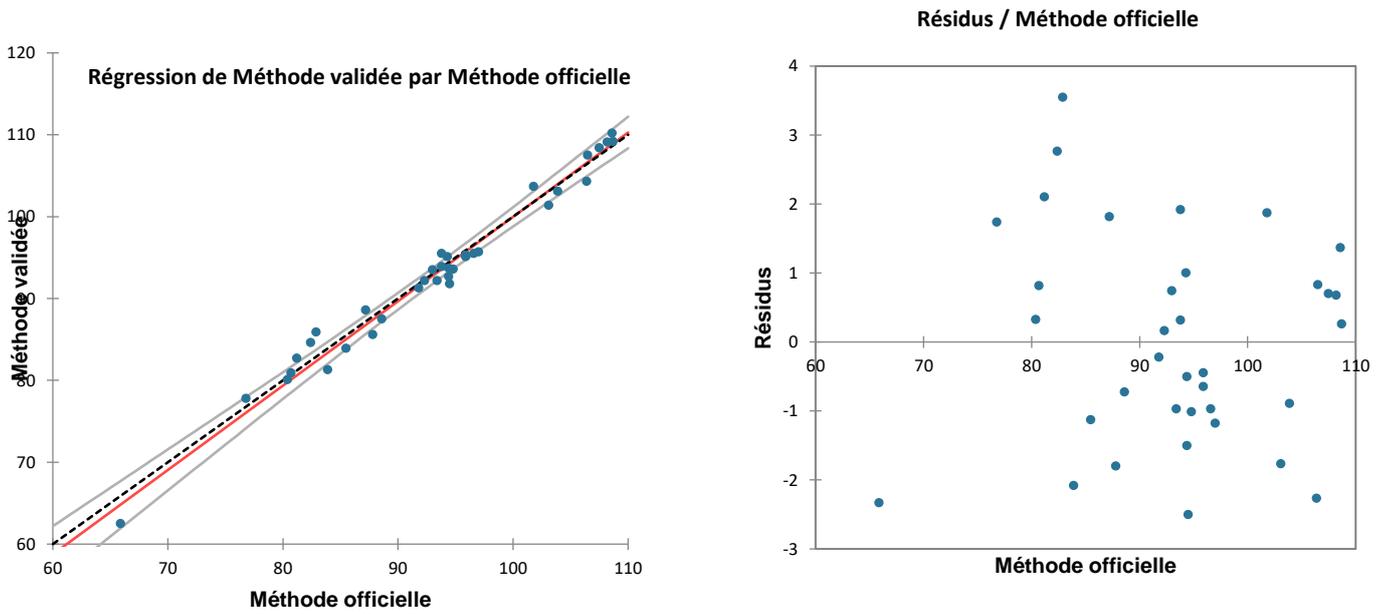


Figure 28. Comparaison des résultats obtenus de céfixime entre les méthodes Spectro UV-VIS et HPLC à partir de la régression de Deming

Tableau XLI. Comparaison des résultats de dosage des suspension de l'érythromycine entre la méthode validée et officielle

ECH	Forme	Méthode validée (%)	Méthode officielle (%)
ERH001	Suspension	110,0	108,4
ERH002	Suspension	106,3	103,9
ERH002	Suspension	101,3	96,7
ERH013	Suspension	102,4	98,9
ERH014	Suspension	99,9	98,6
ERH015	Suspension	103,3	99,6
ERH017	Suspension	85	81,99

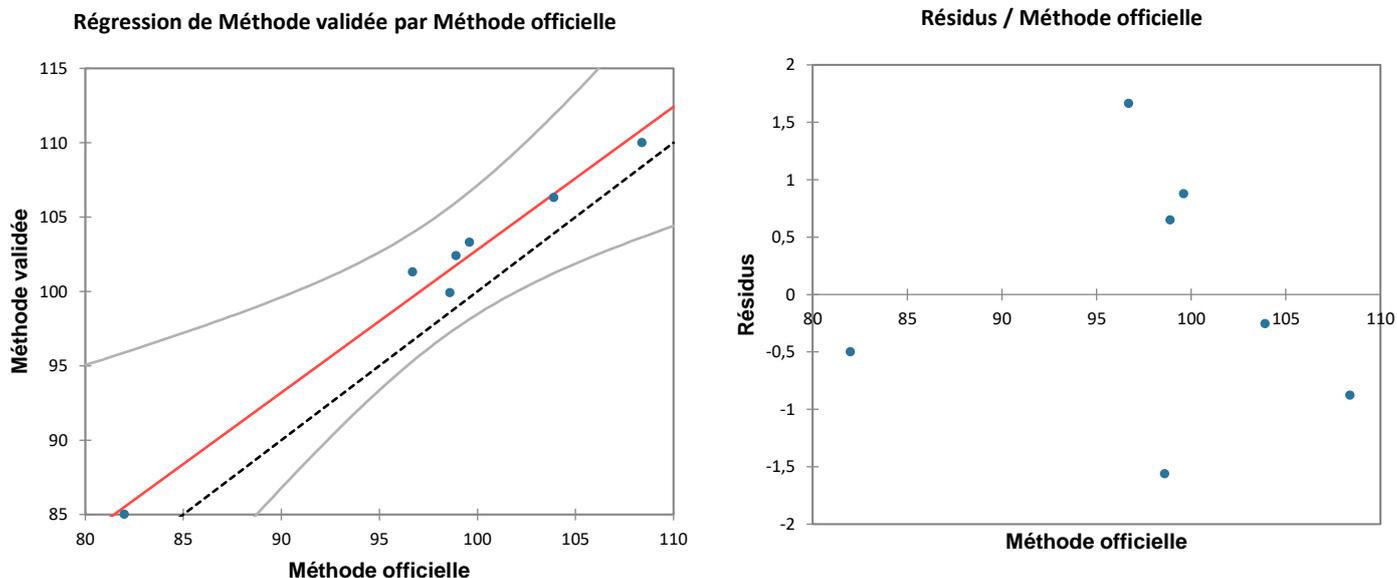


Figure 29. Comparaison des résultats obtenus de l'érythromycine entre les méthodes validée et officielle à partir de la regression de Deming

V.5.4. Aperçu général de la conformité des échantillons analysés

Sur un total de 112 échantillons analysés dans ce travail, 24 (21 %) ont été de mauvaise qualité. Celle-ci a été due à une quantité inférieure du principe actif par rapport à celle déclarée par le fabricant. Les échantillons sous-standards ont présenté des irrégularités diversifiées de teneur en principe actif, la plus faible teneur était de 31 % en dehors des limites de la pharmacopée américaine.

Septante et un pour cent (71 %) des échantillons hors spécifications étaient originaires de l'Inde, 25 % ont été fabriqués localement et 4 % provenaient de la France. Il a été établi que 75 % de médicaments FQI dans le monde sont originaires de l'Inde (Harris et Steven, 2008). Dans cette même optique, Saurabh *et al* (2014) avaient rapporté que l'Inde est non seulement un des plus grands producteurs de médicaments FQI, mais il a aussi un énorme marché pour les médicaments FQI. Cependant, Shah *et al* (2015) avaient montré que des chiffres avancés sur la prévalence de médicaments FQI en Inde étaient exagérés, cela ternit certainement l'image de l'Inde qui devient le premier fournisseur des médicaments génériques au monde.

Les comprimés ont présenté 45 % de non conformités suivis de suspensions buvables (38 %) et 17 % pour les gélules. Ce constat se diffère de celui fait par Mwamba (2017) qui avait trouvé

que la forme suspension buvable était la plus représentée avec 54 % de non-conformités, suivie des comprimés (30 %), des gélules (13 %) et des sirops (3 %).

Dans son étude, Robin (2013) avait rapporté que le coût de médicaments à l'achat et l'existence de différentiels de prix importants incitent les falsificateurs à fournir des médicaments falsifiés à de bas prix. Dans le cadre de ce travail, nous avons corrélé l'impact de prix des médicaments à la qualité des échantillons collectés. Ci-haut, nous avons rapporté que le céfixime a été l'antibiotique le plus coûteux et le prix des échantillons variait entre 1,44 et 20,00 USD. Il a été constaté que les échantillons pour lesquels le prix était inférieur à 5 USD, ont représenté 75 % (9/12) des non-conformités en termes de teneur en céfixime. Concernant le céfadroxil dont le prix des échantillons variait entre 1,34 et 8,25 USD et azithromycine (0,83 et 11,88 USD), nous avons fait presque le même constat. En effet, les échantillons pour lesquels le prix était inférieur à 2 USD ont représenté 67 % (4/6) des non conformités pour céfadroxyl et 75 % (3/4) pour azithromycine. Concernant l'érythromycine, tous les échantillons collectés ne coûtaient pas plus de un dollar chacun.

Ces constatations peuvent sous-entendre que le prix des échantillons aurait de l'influence sur la qualité des échantillons collectés. Ceci peut se justifier par le fait que sur 24 échantillons hors spécifications trouvés dans ce travail, 63 % ont été collectés dans les circuits informels de distribution des médicaments. En effet, dans ces circuits, les vendeurs peuvent essayer de rabaisser le prix des médicaments pour attirer la population qui pour la plupart est pauvre. En outre, les conditions dans lesquelles les médicaments y sont conservés, ne sont pas toujours appropriées. Il existe aussi une forte probabilité pour que les médicaments arrivent par contrebande dans ces circuits est grande. Or, les médicaments arrivés par contrebande ne peuvent pas faire l'objet de contrôle par l'Autorité de Réglementation Pharmaceutique avant leur commercialisation. Le constat fait dans ce travail se rapproche de celui fait par Shrivastava *et al* (2018) à Kinshasa sur la qualité de médicaments principalement des antibiotiques (amoxicilline) et antipaludéens (artémether-luméfanthrine) *per os* commercialisés dans des établissements de vente en gros (circuit formel de distribution). Cette étude a montré que 27 % (avec n = 239) de médicaments de mauvaise qualité provenaient de circuit formel de distribution de médicaments. En revanche, au Togo, 13 % des antibiotiques prélevés dans le circuit informel n'étaient pas conformes aux spécifications de la Pharmacopée Américaine et 5 % de non conformités étaient enregistrées dans le circuit formel de distribution (Schafermann *et al.*, 2018).

D'une part, de 24 échantillons hors spécifications trouvés dans ce travail, 46 % étaient enregistrés et autorisés à être commercialisés au pays. Ceci sous-entend que les autorités sanitaires n'ont pas pu déceler les irrégularités que présentaient ces échantillons, cette constatation serait (i) soit due au fait que ces échantillons n'ont pas été carrément analysés et l'AMM a été octroyée aux fabricants sans attendre les résultats issus des analyses quantitatives (ii) soit les échantillons ont bien été analysés mais la méthode analytique utilisé n'a pas été performante et n'a pas permis à détecter cette mauvaise qualité.

D'autre part, nous avons noté que les échantillons hors spécifications ne disposant pas d'AMM ont présenté 54 % des non conformités. Il est évident que des actions coercitives et coordonnées visant à combattre la vente (i) des médicaments sans autorisation de mise sur le marché et (ii) la vente des médicaments dans le circuit informel aurait un impact considérable dans la lutte contre la circulation des médicaments FQI, d'autant plus que sur 24 échantillons hors spécifications, 63 % ont été collectés dans le circuit informel.

Enfin, il a été trouvé dans ce travail que la proportion des médicaments hors spécifications dans le circuit informel a été supérieure par rapport à ceux collectés dans le formel (54% vs 11 % ; $p < 0.05$) (tableau XLII) (figure 30). Ce constat corrobore les données avancées, selon lesquelles la présence importante du marché illicite des médicaments est un facteur potentiel qui favorise la circulation de médicaments de qualité douteuse (Mackey et Liang., 2011 ; Mwamba et al, 2015).

Tableau XLII. Conformité des échantillons en fonction du site de collecte

	Médicaments conformes	Médicaments non conformes	Total
Médicaments collectés dans le circuit formel	75 (89 %)	9 (11 %)	84 (100 %)
Médicaments collectés dans le circuit informel	13 (46 %)	15 (54 %)	28 (100 %)

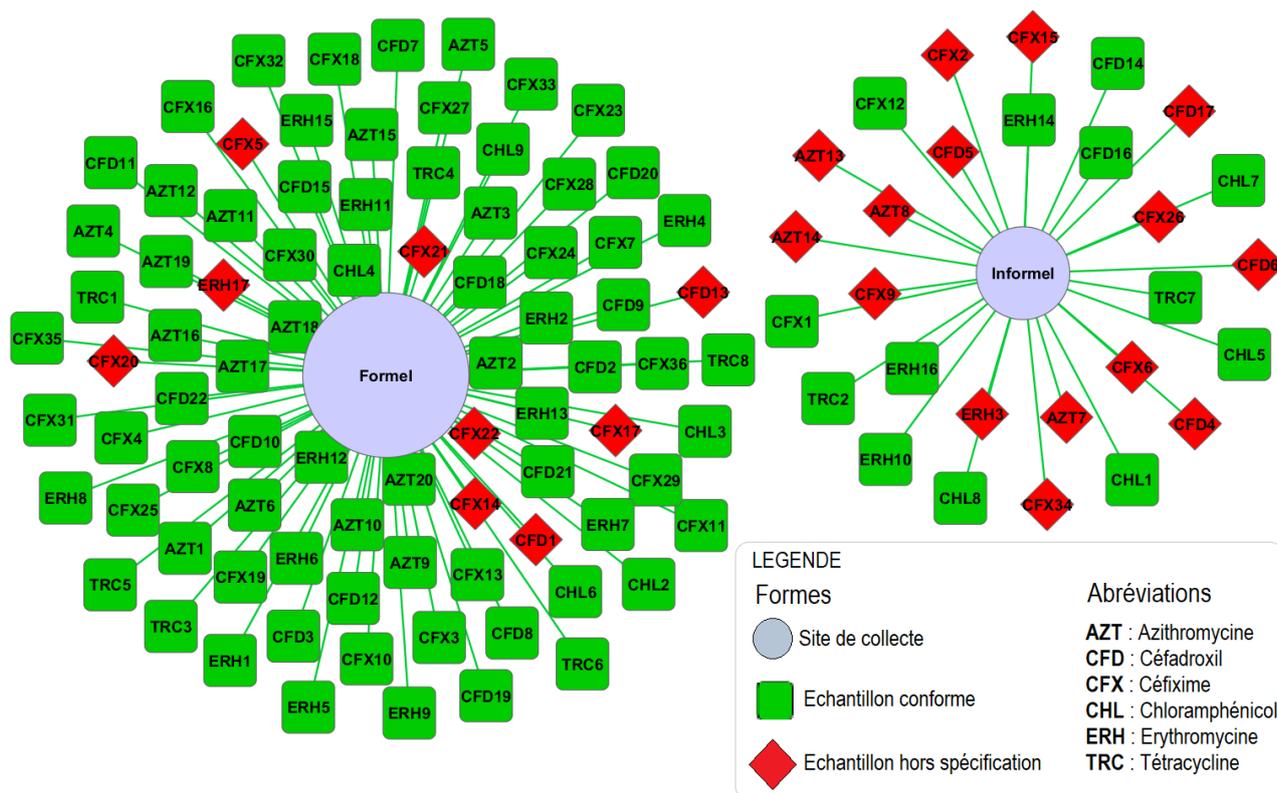


Figure 30. Interconnexion des échantillons en fonction de leur site de collecte et conformité

Le point suivant revient sur les résultats obtenus avec les tests de physiques et pharmaceutiques.

V.6. TESTS PHYSIQUES ET PHARMACOTECHNIQUES

Nous présentons dans ce point les résultats des essais suivants : uniformité de masse et de teneur, dureté et friabilité des comprimés, désagrégation des comprimés et des gélules ainsi que les résultats du pH et volume délivrable des suspensions buvables.

V.6.1. Uniformité de masse et test de variation de masse

Au total, 70 échantillons ont été soumis aux essais de l'uniformité de masse et de teneur. Ils étaient constitués de 48 en gélules et 22 en comprimés et sont répartis de la manière suivante :

- 22 de céfixime
- 12 de céfadroxyl
- 10 de l'azithromycine
- 9 de l'érythromycine

- 9 de chloramphénicol
- 8 de tétracycline

Les résultats de ces deux essais sont condensés dans le tableau XLIII

Tableau XLIII. Résultats de l'uniformité de masse et test de variation de masse

ECH	Forme et dosage	Poids moyen (g)	Ecart-type	Coeff. de variation	Nbre d'unités hors limite	(AV ≤15,00)	Conclusion
AZT013	Cé 500mg	0,8133	0,0034	0,0042	-	3,65	Conforme
AZT001	Cé 500mg	0,7150	0,0451	0,0630	1	4,21	Conforme
AZT010	Cé 500mg	0,8592	0,0108	0,0125	-	2,68	Conforme
AZT011	Cé 500mg	0,604	0,0010	0,0035	-	3,79	Conforme
AZT014	Cé 500mg	0,7649	0,0097	0,012	-	5,98	Conforme
AZ00T4	Cé 500mg	0,85009	0,0058	0,008	1	10,32	Conforme
AZT005	Cé 250mg	0,3544	0,0031	0,009	-	6,32	Conforme
AZT006	Cé 250 mg	0,3494	0,0045	0,013	-	8,25	Conforme
AZT007	Cé 500mg	0,85094	0,0030	0,0043	-	9	Conforme
AZT009	Cé 500mg	0,7888	0,0053	0,0067	-	0,85	Conforme
CFD001	Gel 500 mg	0,6586	0,0059	0,0090	-	7,95	Conforme
CFD010	Gel 500 mg	0,5192	0,0117	0,0225	-	6,54	Conforme
CFD012	Cé 500 mg	0,5669	0,0058	0,0103	-	8,29	Conforme
CFD015	Gel 500 mg	0,6013	0,0151	0,0251	-	3,85	Conforme
CFD016	Gel 500 mg	0,5364	0,0105	0,0195	-	6,21	Conforme
CFD017	Gel 500 mg	0,5525	0,1050	0,0189	-	1,65	Conforme
CFD004	Gel 500 mg	0,5426	0,0067	0,0124	-	2,98	Conforme
CFD005	Gel 500 mg	0,5141	0,0121	0,0236	-	7,52	Conforme
CFD006	Gel 500 mg	0,5171	0,0078	0,015	-	0,4	Conforme
CFD007	Gel 500 mg	0,5865	0,0142	0,0247	-	4,98	Conforme
CFD008	Gel 500 mg	0,5575	0,0159	0,0285	-	7,36	Conforme
CFD009	Gel 500 mg	0,55619	0,193	0,0348	-	1,25	Conforme
CFX001	Cé 200 mg	0,3427	0,0006	0,0194	-	0,31	Conforme
CFX012	Cé 200 mg	0,5099	0,006	0,0118	-	3,68	Conforme
CFX016	Gel 200 mg	0,3245	0,0022	0,007	-	4,81	Conforme
CFX017	Cé 200 mg	0,3758	0,0018	0,005	-	6,21	Conforme
CFX018	Cé 200 mg	0,3106	0,0029	0,0095	1	10,01	Conforme
CFX019	Cé 200 mg	0,3579	0,0021	0,0058	-	3,83	Conforme
CFX002	Cé 200 mg	0,3974	0,0035	0,0089	-	5,12	Conforme
CFX021	Cé 200 mg	0,5061	0,0131	0,0259	-	2,56	Conforme
CFX022	Cé 200 mg	0,3325	0,0023	0,007	-	3,94	Conforme
CFX023	Cé 200 mg	0,3025	0,0008	0,007	-	0,4	Conforme
CFX024	Cé 200 mg	0,3175	0,0018	0,0059	-	4,23	Conforme
CFX025	Cé 100 mg	0,2145	0,0022	0,0105	-	7,97	Conforme
CFX028	Cé 200 mg	0,4365	0,0013	0,0029	-	5,38	Conforme
CFX029	Cé 200 mg	0,4987	0,0037	0,0075	-	2,56	Conforme
CFX030	Cé 200 mg	0,3326	0,0013	0,0039	-	4,51	Conforme
CFX032	Cé 200 mg	0,3116	0,0045	0,0145	-	8,67	Conforme
CFX033	Gel 200 mg	0,3465	0,0051	0,0149	-	1,09	Conforme

ECH	Forme et dosage	Poids moyen (g)	Ecart-type	Coeff. de variation	Nbre d'unités hors limite	(AV ≤15,00)	Conclusion
CFX034	Cé 200 mg	0,3769	0,0037	0,01	-	0,34	Conforme
CFX036	Cé 200 mg	0,2453	0,0055	0,2273	-	0,31	Conforme
CFX004	Cé 100 mg	0,2756	0,0036	0,0132	-	7,5	Conforme
CFX005	Cé 200 mg	0,4613	0,0019	0,0043	-	5,7	Conforme
CFX008	Cé 200 mg	0,2789	0,0074	0,02663	-	1,6	Conforme
CHL001	Gel 250mg	0,3047	0,0006	0,0224	-	4,7	Conforme
CHL002	Gel 250mg	0,3102	0,0053	0,017	-	1,9	Conforme
CHL003	Gel 250mg	0,2994	0,013	0,0287	-	6,4	Conforme
CHL004	Gel 250mg	0,3322	0,005	0,0602	-	4,6	Conforme
CHL005	Gel 250mg	0,3102	0,0096	0,0305	-	3,7	Conforme
CHL006	Gel 250mg	0,3049	0,0024	0,0078	-	2,5	Conforme
CHL007	Gel 250mg	0,3104	0,004	0,1301	-	4,8	Conforme
CHL008	Gel 250mg	0,3026	0,0015	0,0051	-	7,3	Conforme
CHL009	Gel 250mg	0,3127	0,0199	0,0639	-	16,2	Non conforme
ERH001	Cé 500 mg	0,6512	0,0002	0,0003	-	1,1	Conforme
ERH002	Cé 250 mg	0,3171	0,0003	0,0012	-	1,0	Conforme
ERH003	Cé 500mg	0,6213	0,0024	0,0039	-	1,7	Conforme
ERH004	Cé 250 mg	0,3094	0,0002	0,0008	-	0,9	Conforme
ERH005	Cé 500 mg	0,6415	0,0001	0,0003	-	2,2	Conforme
ERH006	Cé 250 mg	0,3254	0,0002	0,0006	-	6,3	Conforme
ERH007	Cé 250 mg	0,3014	0,0003	0,0011	-	5,0	Conforme
ERH008	Cé 500 mg	0,6369	0,0002	0,0003	-	5,6	Conforme
ERH009	Cé 250 mg	0,3142	0,0003	0,0011	-	0,8	Conforme
TRC001	Gel 250 mg	0,3527	0,0079	0,0224	-	2,5	Conforme
TRC002	Gel 250 mg	0,31562	0,01115	0,0417	-	14,4	Conforme
TRC003	Gel 250 mg	0,3156	0,0108	0,0343	3	28,7	Non conforme
TRC004	Gel 250 mg	0,311	0,0172	0,0553	-	9,7	Conforme
TRC005	Gel 250 mg	0,3025	0,0224	0,0741	-	6,4	Conforme
TRC006	Gel 250 mg	0,3253	0,0141	0,0434	-	1,5	Conforme
TRC007	Gel 250 mg	0,3317	0,0157	0,0463	-	2,6	Conforme
TRC008	Gel 250 mg	0,3401	0,0115	0,0344	-	3,5	Conforme

Légende : Ech. : AV : Acceptance Value ; AZT : azithromycine ; CFD : céfadroxil ; CFX : céfixime ; CHL : chloramphénicol ; ERH : érythromycine ; TRC : tétracycline.

Les comprimés contenant l'azithromycine pesaient en moyenne $0,6650 \text{ g} \pm 0,2315$, le plus lourd pesait $0,8592 \text{ g}$ et le plus léger $0,3040 \text{ g}$. Le coefficient de variation était compris entre $0,0035$ et $0,063 \%$ quel que soit la tranche de poids du comprimé. Les comprimés de céfadroxyl ont présenté un poids moyen de $0,5590 \text{ g} \pm 0,041$ avec un poids maximum de $0,6586 \text{ g}$ et $0,5141 \text{ g}$ comme poids minimal. Le coefficient de variation était compris entre $0,009$ et $0,0348$. S'agissant des comprimés de céfixime, ils ont présenté en moyenne $0,3571 \text{ g} \pm 0,082$ avec un poids maximal de $0,5099 \text{ g}$ et minimal $0,2145 \text{ g}$. Le coefficient de variation était compris entre $0,0029$ et $0,2273$. Le poids moyen de chloramphénicol était de $0,3097 \text{ g} \pm 0,0094$, poids maximal ($0,3322 \text{ g}$), minimal ($0,2994 \text{ g}$) et coefficient de variation ($0,0051$ à $0,1301$). Pour tétracycline, le poids moyen était de $0,3243 \text{ g}$, poids maximal ($0,3243 \text{ g}$), minimal ($0,3025 \text{ g}$) et coefficient de variation ($0,0224$ à $0,0741$). Les comprimés d'érythromycine ont présenté un poids moyen de $0,4574 \text{ g} \pm 0,1711$, poids maximal ($0,6512 \text{ g}$), minimal ($0,3014 \text{ g}$), coefficient de variation ($0,0001$ à $0,0039$).

De 70 échantillons soumis à l'essai d'uniformité de masse, un seul était non conforme selon les spécifications de la pharmacopée européenne. En effet, trois unités ($83,71 \%$, $88,88 \%$ et $85,11 \%$) d'un échantillon de tétracycline était en dehors des limites établies. Dans leur étude, Gaudiano *et al* (2007) avaient aussi trouvé des non-conformités ($12,5\%$) liées au test de l'uniformité de masse. Par contre, tous les échantillons analysés par Tamdem et Nnanga (2014) avaient satisfait au test d'uniformité de masse.

Etant donné que le test d'uniformité de masse permet de vérifier que les poids individuels de chaque unité se trouvent dans les limites établies par rapport à la masse moyenne de l'échantillon, il y a lieu de se poser également des questions sur la répartition uniforme de la substance active dans chaque unité.

Les résultats de test de variation de masse obtenus dans ce travail ont montré que deux échantillons ont été non conformes à cet essai avec une valeur d'acceptation supérieure à 15 ($16,24$ et $28,68$). Ces types de non-conformités peuvent être responsables d'échec thérapeutique ou de résistance dans la prise en charge des pathologies infectieuses car les unités de l'échantillon ne contiennent pas une teneur individuelle en principe actif recommandée afin de permettre au patient de consommer une dose constante du principe actif pendant toute la durée du traitement. Sur 133 échantillons soumis au test de variation de masse par Lehmann *et al* (2018) en Afrique du Sud, seulement un échantillon avait présenté une valeur d'acceptation supérieure à 15% ($17,8 \%$).

En Mongolie, Khurelbat *et al* (2020) avaient trouvé 30 % de non conformités des échantillons soumis à l'essai de test de variation de masse alors au Niger Musa *et al* (2011) au Niger, avaient obtenu 100 % de non conformités relatives au test de variation de masse.

V.6.2. Test de friabilité

Le tableau XLIV montre les résultats qui ont été obtenus avec le test de friabilité. Les échantillons (n= 5) soumis à cet essai ont tous présenté un taux de friabilité inférieur à 1 %, montrant ainsi la conformité de ces échantillons selon les spécifications de la Pharmacopée Européenne (< 1 %).

Tableau XLIV. Résultats de test de friabilité

ECH	Masse initiale (g)	Masse après (g)	Taux de friabilité (%)	Conclusion
CFX003	3,422	3,410	0,348	Conforme
CFX002	3,965	3,945	0,494	Conforme
CFX004	4,611	4,600	0,239	Conforme
CFX008	3,759	3,733	0,689	Conforme
CFX009	3,104	3,097	0,222	Conforme

Au Cameroun, Nnanga *et al* (2016) ont trouvé que le test de friabilité n'était pas conforme (13,3 %) en analysant 29 échantillons à base d'albendazole. Au Maroc, Koissi (2008) n'a obtenu que des échantillons conformes en rapport avec l'essai de friabilité des échantillons (n= 15) à base de longamycine, vibramycine et doxycycline. Par contre, les résultats trouvés par Musa *et al.* (2011) au Niger ont montré deux non-conformités (taux de friabilité de 9,66 % et 4,06 %) sur 11 échantillons de métronidazole.

V.6.3. Test de dureté

Sont présentés dans le tableau XLV les résultats de test de dureté.

Tableau XLV. Résultats de test de dureté

ECH	Epaisseur (mm)(n= 10)	Diamètre (mm)(n= 10)	Dureté (N) (n= 10)	CV de la dureté (%)	Intervalle de confiance de la dureté moyenne à 5% de risque (N)
CFX014	3,7 ± 0,01	10,4 ± 1,12	102,0 ± 0,70	7,50	101,40 - 102,60
CFX019	3,9 ± 0,14	11,7 ± 0,41	27,5 ± 0,80	29,40	26,90 - 28,10
CFX006	3,6 ± 0,02	10,7 ± 0,05	37,9 ± 1,10	14,58	37,10 - 38,70
ERH003	12,90±0,22	12,52±1,45	145,2± 7,80	12,43	143,70 - 146,70
ERH016	4,19 ± 0,10	12,58 ± 0,30	291,4 ± 0,47	1,58	291,00 - 291,40

L'analyse des données du tableau XLV indique que les comprimés de l'érythromycine présentent une dureté moyenne supérieure à celle des comprimés de céfixime. La force d'application exercée (291,4 N) sur l'échantillon ERH016 a été de loin supérieure à tous les autres échantillons. En outre, l'intervalle de confiance de la dureté moyenne de l'échantillon ERH016 (291,0 N à 291,4 N soit 0,4 N de taille de l'intervalle) est le moins large que les autres échantillons. Par contre, l'échantillon ERH003 présente un intervalle de confiance le plus large (143,3 N à 146,3 N soit 3 N de taille de l'intervalle).

Par ailleurs, le coefficient de variation (CV) de l'échantillon CFX019 est largement supérieur (29,4 %) aux autres échantillons à base de céfixime. Ceci serait notamment due à la différence des excipients utilisés au cours de la fabrication et à la quantité des excipients utilisés dans la production des comprimés mais aussi aux erreurs liées à la procédure de la production des comprimés qui ne sont pas suffisamment minimisées (Belew *et al*, 2018).

Il convient de souligner que pour le test de résistance à la rupture de comprimés, il n'existe pas de manière claire des spécifications. Toutefois, le fabricant peut définir selon ses propres spécifications (*in house specifications*) pour garantir la reproductibilité de la procédure de production de ses comprimés (Koissy, 2008).

Pour interpréter les résultats du test de dureté, Nnanga *et al* (2016) avaient considéré tout d'abord la dureté moyenne de comprimé ensuite ils avaient déterminé les limites inférieure (dureté moyenne multipliée par 0,9) et supérieure (dureté moyenne multipliée par 1,1). La dureté de toutes les unités devrait être comprise entre ces deux limites. Finalement en appliquant cette approche dans notre travail, nous n'avons trouvé aucune non conformité alors que Nnanga *et al* (2016) avaient trouvé que 50 % (7/14) des échantillons étaient non conformes au test de dureté.

V.6.3. Désagrégation des comprimés

Sont repris dans le tableau XLVI, les résultats du test de délitement des échantillons.

Tableau XLVI. Résultats de désintégration des comprimés

ECH	Formes galéniques	Spécifications	Temps de délitement	Conclusion
CFX 1	Comprimé dispersible	< 3 minutes	00' 10"	Conforme
CFX6	Comprimé dispersible	< 3 minutes	00'15"	Conforme
CHL 1	Gélules	< 30 minutes	03'45"	Conforme
CHL 5	Gélules	< 30 minutes	06'42"	Conforme
CHL 4	Gélules	< 30 minutes	03'26"	Conforme
CHL 2	Gélules	< 30 minutes	03'14"	Conforme
ERH 1	Comprimés enrobés	< 60 minutes	05'48"	Conforme
ERH 17	Comprimé enrobés	< 60 minutes	90"00"	Non conforme
ERH5	Comprimé enrobés	< 60 minutes	10'02"	Conforme
TRC 3	Gélules	< 30 minutes	06'24"	Conforme
TRC 4	Gélules	< 30 minutes	04'17"	Conforme

Il est établi que de nombreux paramètres peuvent influencer la désagrégation d'une forme galénique : la nature du matériau, la répartition granulométrique de la poudre, la porosité, la forme des particules, la nature des liaisons interparticulaires, la force de cohésion entre les particules, la température ambiante et l'humidité résiduelle (Ribet, 2003 ; Kalonji, 2012).

Au regard des données présentées dans le tableau XLVI, un échantillon a présenté un temps de délitement largement supérieur à ce qui est prescrit (< 60 min). En effet, au moins trois unités ne se sont pas désagrégées jusqu'à 90 minutes (figure 31). Cette situation ferait que le principe actif présente une mauvaise biodisponibilité une fois dans l'organisme.



Figure 31. Illustration de l'échantillon ayant échoué à l'essai de désagrégation

A Jimma, en Ethiopie, les comprimés d'albendazole, de mébendazole et de praziquantel soumis au test de désagrégation par Belew *et al* (2018) (n= 6) ont tous satisfait à ce test.

En considérant l'ensemble des résultats obtenus avec les différents tests pharmaco-techniques réalisés dans ce travail, il y a lieu de pouvoir corrélérer ces résultats. C'est le cas de test de dureté et celui de désagrégation. Il a été montré ci-haut que les comprimés de l'érythromycine ont présenté une résistance à la rupture supérieure aux autres molécules médicamenteuses. Cette situation a fait que les comprimés de l'érythromycine ont présenté un temps de désagrégation supérieur. En outre, un échantillon de l'érythromycine n'a pas satisfait au test désagrégation. Ce qui laisserait admettre que la désagrégation peut être influencée par la résistance à la rupture des formes galéniques ; avec comme conséquence la difficulté pour la forme pharmaceutique de libérer le principe actif afin que celui-ci soit dissous dans l'organisme. Par contre, le test de friabilité ne pouvait pas être corrélé avec le temps de délitement des comprimés de l'érythromycine car ceux-ci étaient enrobés.

S'agissant des essais de l'uniformité de masse et de test de variation de masse, nous avons trouvé qu'un échantillon n'a pas été conforme à ces deux tests alors qu'un autre échantillon a satisfait à l'essai de l'uniformité de masse mais n'a pas été conforme au test de variation de masse. Ce dernier prend en compte la teneur en principe actif, le poids des différentes unités soumises au test ainsi que leur dispersion alors que, pour le test de l'uniformité de masse, on ne considère que la répartition uniforme de poids des unités soumises à ce test. Sur ce, le test de

variation de masses est plus révélateur en termes des informations fournies, que ce soit sur la répartition de poids et que sur la teneur en principe actif dans différentes unités d'un échantillon.

V.6.4. Résultats du pH et du volume à reconstituer

La détermination du volume à reconstituer et du pH des suspensions buvables a été effectué sur 32 échantillons dont : 14 de céfixime, huit d'érythromycine, cinq de céfadroxyl et cinq d'azithromycine.

Comme indiqué dans le tableau XLVII, aucune non-conformité n'a été trouvée après avoir déterminé le volume à reconstituer des Suspensions buvables. En effet, pour tous les échantillons analysés le volume était supérieur à 90 %. Dans son étude Kalonji (2012) n'avait trouvé aucune non-conformité avec les volumes extractibles des Suspensions, l'étude avait toutefois noté un déficit de plus de 10 % des solutions pour gouttes buvables. Pour les suspensions buvables d'azithromycine, le pH variait entre 8,98 et 9,23 ; de 5,04 à 5,68 pour céfadroxil ; de 5,25 à 5,89 pour céfixime et 8,21 à 9,21 pour érythromycine.

Tableau XLVII. Résultats de pH et volume à reconstituer des suspensions buvables

Echantillon	Dosage déclaré (mg/5mL)	pH	Volume à reconstituer	Conclusion
AZT002	200	9,2	103,2	Conforme
AZT003	200	9,2	98,6	Conforme
AZT008	100	9,1	101,5	Conforme
AZT012	250	9,0	96,4	Conforme
AZT015	100	9,2	104,7	Conforme
CFD002	250	5,4	109,2	Conforme
CFD003	250	5,7	93,9	Conforme
CFD0011	250	5,0	95,7	Conforme
CFD014	250	5,2	102,4	Conforme
CFD013	250	5,6	107,7	Conforme
CFX026	100	5,8	100,8	Conforme
CFX027	50	5,5	97,9	Conforme
CFX028	100	5,7	103,6	Conforme
CFX029	40	5,8	107,6	Conforme
CFX030	100	5,5	95,4	Conforme
CFX031	100	5,7	101,3	Conforme
CFX032	100	5,6	97,9	Conforme
CFX033	200	5,7	107,6	Conforme
CFX034	100	5,3	94,7	Conforme
CFX035	200	5,3	102,3	Conforme
CFX036	40	5,6	95,7	Conforme
ERH001	250	8,8	105,7	Conforme
ERH002	250	8,6	104,5	Conforme

Echantillon	Dosage déclaré (mg/5mL)	pH	Volume à reconstituer	Conclusion
ERH010	125	8,9	103,1	Conforme
ERH011	125	8,2	95,8	Conforme
ERH012	250	8,5	98,6	Conforme
ERH013	125	9,0	97,9	Conforme
ERH014	125	8,8	102,2	Conforme
ERH015	125	9,0	93,3	Conforme

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les médicaments falsifiés et de qualité inférieure (FQI) constituent un danger permanent qui compromet l'amélioration de la santé de la population. Le phénomène de la falsification des médicaments frappe davantage les pays en développement par manque de rigueur et de stratégie efficace dans le contrôle qualité des médicaments. Ce travail a consisté à relever ce défi en apportant notre contribution à la lutte contre la consommation de médicaments falsifiés et de qualité inférieure.

Ce travail de thèse a donc poursuivi les objectifs suivants : (i) d'identifier les antibiotiques les plus utilisés à Lubumbashi (ii) de rechercher dans la littérature de méthodes d'analyse utilisées dans la détection des antibiotiques FQI (iii) de développer de méthodes d'analyse simples, adéquates et performantes pour ensuite les valider (iv) d'appliquer ces méthodes développées et validées aux échantillons prélevés à Lubumbashi et (v) d'appliquer les méthodes de pharmacotechnie et physiques à ces échantillons.

Six molécules d'antibiotiques : azithromycine, céfadroxil, céfixime, chloramphénicol, érythromycine et tétracycline ont été sélectionnées sur base de leur utilisation dans les milieux hospitaliers à Lubumbashi.

La revue bibliographique systématique relative aux méthodes d'analyse des médicaments FQI a permis de prendre en compte la chromatographie liquide à haute performance et la spectrophotométrie UV-Vis. La méthode d'analyse HPLC a concerné quatre antibiotiques : azithromycine, céfadroxil, chloramphénicol et érythromycine tandis que la spectrophométrie UV-Vis a été utilisée pour trois antibiotiques : céfixime, érythromycine et tétracycline.

La mise au point des méthodes d'analyse s'est réalisée en trois phases : développement et validation et application.

La phase du développement a eu pour objectif d'obtenir des conditions expérimentales optimale pour identifier et doser les analytes de l'étude. La validation des méthodes analytiques a été réalisée en utilisant la stratégie du profil d'exactitude. L'application a consisté à se servir des méthodes validées pour analyser les échantillons collectés à Lubumbashi.

Les conditions expérimentales finales obtenues pour la méthode d'analyse de l'azithromycine et érythromycine ont été : tampon acétate d'ammonium 10 mM ajusté à pH 10, température du four de la colonne 35°C, mode d'élution isocratique avec phase mobile méthanol/tampon : (80÷20). Pour la méthode d'analyse HPLC de céfadroxyl et de chloramphénicol, les conditions retenues sont les suivantes : tampon acétate d'ammonium 10 mM ajusté à pH 6, température du

four de la colonne 25°C, mode d'élution isocratique avec phase mobile méthanol/tampon : 5÷95.

Pour le développement des méthodes spectrophotométriques UV-Vis les conditions analytiques suivantes ont été retenues pour céfixime : longueur d'onde 220 nm, diluant l'eau, concentration cible 40 µg/mL ; pour érythromycine : longueur d'onde 215 nm, diluant méthanol, concentration cible 500 µg/mL et pour tétracycline : longueur d'onde 270 nm, diluant l'eau, concentration cible 10 µg/mL. Par ailleurs, pour le chloramphénicol la méthode décrite dans la Pharmacopée Britannique a été utilisée.

Les méthodes d'analyse développées de l'azithromycine, céfadroxil, érythromycine et tétracycline sont valides. Ce qui n'était pas le cas avec la méthode d'analyse de céfixime à cause de l'effet de matrice sur la préparation. La méthode des ajouts-dosés a donc été préconisée pour analyser les échantillons de céfixime.

L'application des méthodes validées aux échantillons d'antibiotiques collectés a montré que, sur un total de 112 échantillons analysés, 24 (21 %) étaient sous-standards à cause de la quantité inférieure du principe actif par rapport à celle déclarée par le fabricant.

Les résultats relatifs à l'aspect pharmaco-technique des échantillons collectés ont montré que sur 70 échantillons soumis à l'essai d'uniformité de masse, un seul a été non conforme. Par contre, les résultats de test de variation de masse ont montré que deux échantillons ont été non conformes avec une *Acceptance Value* (AV) supérieur à 15. Pour le test de désagrégation un seul a été non conforme alors que pour les tests de dureté et de friabilité, nous n'avons noté aucune non conformité. Aucune non conformité n'a été trouvée avec les tests de détermination de pH et du volume à reconstituer de suspensions buvables.

A l'issue de ce travail, cinq nouvelles méthodes d'analyse simples, performantes et adéquates ont été mises au point. Ces méthodes ne sont pas complexes et sont moins coûteuses dans leur exécution car elles ne font appel qu'à des intrants simples et couramment disponibles dans nos laboratoires. L'application en routine de ces méthodes pourra être avantageuse dans le renforcement des laboratoires de contrôle qualité des médicaments afin de mieux garantir la qualité des antibiotiques (étudiés dans ce travail) que la population consomme au pays.

A cet effet, nous suggérons que la stratégie analytique à appliquer pour détecter les médicaments falsifiés et de qualité inférieure puissent aussi tenir compte de (i) l'utilisation des méthodes validées et/ou référentielles dans les laboratoires de contrôle qualité des médicaments afin d'améliorer la fiabilité des résultats obtenus par les méthodes analytiques et d'accroître la confiance dans les décisions quotidiennes que prennent les autorités sanitaires dans la libération

des lots des médicaments sur le marché (*ii*) l'utilisation de standard des médicaments dans toutes les opérations d'analyse des médicaments (*iv*) la disponibilité dans les laboratoires de contrôle qualité, de la liste officielle des médicaments enregistrés et autorisés à être commercialisés au pays et (*v*) la mise en place d'un système qualité dans les laboratoires de contrôle qualité des médicaments en vue de répondre de manière adéquate aux demandes faites par les clients (firmes pharmaceutiques, agences des médicaments, etc.).

Par ailleurs, nous suggérons aux autorités politico-administratives du pays de (*i*) de mettre en place une politique efficace ayant pour objectif principal d'endiguer la vente des médicaments dans les circuits de distribution informels (*ii*) équiper les laboratoires en matériel et appareils pour mieux répondre aux défis liés aux opérations d'analyse des médicaments (*iii*) mettre à disposition des moyens nécessaires en vue d'assurer la formation continue des pharmaciens analystes commis à la tâche de contrôle qualité des médicaments (*iv*) mettre en place un système qui pourra permettre aux laboratoires de s'approvisionner en standard des médicaments, qui constitue un élément indispensable dans le contrôle qualité des médicaments et (*v*) renforcer la surveillance pour que tous médicaments qui circulent au pays soit préalablement enregistrés et autorisés avant d'être mis sur le marché.

A l'issue de ce travail, des perspectives potentielles de recherches peuvent être envisagées :

- Vulgariser et standardiser les méthodes mises au point dans ce travail ;
- Faire fonctionner ces méthodes en collaboration avec le Ministère de la Santé Publique du pays ;
- Déterminer les impuretés et/ou des substances apparentées susceptibles d'accompagner les antibiotiques étudiés ;
- Contrôler la qualité des médicaments commercialisés au pays en collaboration avec la Direction de la Pharmacie, Médicaments et Laboratoires du Ministère de la Santé Publique du pays afin de garantir la qualité des médicaments que la population consomme ;
- Prendre en compte d'autres classes thérapeutiques des médicaments largement utilisés au pays.

BIBLIOGRAPHIE

- Abualhasan MN, Batrawi N, Sutcliffe OB & Zaid AN (2012). A validated stability-indicating HPLC method for routine analysis of an injectable lincomycin and spectinomycin formulation. *Sci Pharm.* **80**:977–86.
- Acharya DR & Patel DB. (2013). Development and validation of RP-HPLC Method for simultaneous estimation of cefpodoxime proxetil and dicloxacillin sodium in tablets. *Indian J Pharm Sci.* **75**:31–5.
- ACTWATCH (2017). Enquête sur les points de vente d'antipaludiques, République Démocratique du Congo, Kinshasa et Katanga
http://www.actwatch.info/sites/default/files/content/publications/attachments/DRC_2015%20OS_Brief_French.pdf. Consulté le 12 Novembre 2019.
- Ahmed M, Babu S & Shetty S. (2011). Development and validation of amoxicillin by RP-HPLC method in bulk drug and pharmaceutical dosage forms. *Int J Chem Tech Res.* **3**:1037–41.
- Ahuja S & Jimidar MI (2008). Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis, separation science and technology. *Academic Press.* **8**:1-14
- Aka E, Legris C, Tanimoto T, Matsushita R & Kimura K (2005). Counterfeit medicine detection by authenticity investigation: a pilot study in the street market of Côte d'Ivoire. *Japanese Society of Social Pharmacy.* **24**:7–16.
- Akl MA, Ahmed MA & Ramadan A (2011). Validation of an HPLC-UV method for the determination of ceftriaxone sodium residues on stainless steel surface of pharmaceutical manufacturing equipments. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **55**: 247–52.
- Al-dgither S, Alvi SN & Hammami MM (2006). Development and validation of an HPLC method for the determination of gatifloxacin stability in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**:251–55.
- Al-qatamin S (2012). The evaluation and analysis of counterfeit pharmaceuticals within Jordan. [Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en pharmacie]. Jordan : Université de Coventry.
- Alekshun MN & Levy SB (2007). Review Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell.* **5**:1037–50.
- Almuzaini T, Choonara I & Sammons H (2013). Substandard and counterfeit medicines: a systematic review of the literature. *British medical journal.* **3**: e002923.
- Amin AS, El-Fetouh T, Gouda AA, El-Sheikh, R, Zahran, F. (2007). Spectrophotometric determination of gatifloxacin in pure form and in pharmaceutical formulation. *Spectrochim.*

Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. **67** :1306–12.

Anonyme (2014). Substandard meds flood Afghan market. En ligne sur: http://www.Dddmag.com/news/2014/11/sub-standard-meds-flood-afghan-market?et_cid=4273383&et_rid=45532557&type=headline. Consulté le 6 juin 2015.

Arayne MS, Sultana N & Siddiqui FA (2007). Optimization of levofloxacin analysis by RP-HPLC using multivariate calibration technique. *Pak J Pharm Sci.* 20:100–6.

Ashour S & Bayram R (2015). Development and validation of sensitive kinetic spectrophotometric method for the determination of moxifloxacin antibacterial agent in pure and commercial tablets. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* **140**:216–22.

Asiah B (2009). Counterfeit medicine: A threat to the public health and pharmaceutical industry. *International conference on corporate law. 1st-3rd*. Surabaya. Indonesie.

Assi RA, Darwis Y, Abdulbaqi IM & Asif SM (2017). Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the detection and quantification of azithromycin in bulk, and self-emulsifying drug delivery system (SEDDs) formulation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* **7**: 20-29.

Atici BE, Yazar Y, Ağtaş Ç, Ridvanoğlu N & Karlığa, B (2017). Development and validation of stability indicating HPLC methods for related substances and assay analyses of amoxicillin and potassium clavulanate mixtures. *J Pharm Biomed Anal.* **136**:1–9.

Aucamp ME, Csongradi C, Gerber M, Plessis DJ (2016). A novel RP-HPLC method for the detection and quantification of roxithromycin in topical delivery studies. *Pharmazie.* **71**:175–6.

Ayele AA, Gebresillassie BM, Erku DA, Gebreyohannes EA, Demssie DG, Mersha AG, *et al.* (2018). Prospective evaluation of Ceftriaxone use in medical and emergency wards of Gondar university referral hospital, Ethiopia. *Pharmacol. Res. Perspect.* **6**:1–7.

Babu KR, Kumari NA & Vasundhara A (2014). A Noval Method Development and validation of Imipenem in Bulk and Injection Formulations By Spectrophotometric and RP-HPLC Methods. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* **3**:986–1002.

Baghel S, Kulshrestha P & Shukla RN (2012). Validated spetrophotometric and RP- HPLC method for estimation of cefuroxime axetil and cefixime trihydrate in tablet dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development.* **4**: 85-92.

Bambeke VF & Tulkens P (2008). Pharmacologie et pharmacothérapie anti-infectieuse. Syllabus national Belge de pharmacologie. *Unité de pharmacologie cellulaire et moléculaire.* Université Catholique de Louvain.

- Baraka MM, Elsadek ME & Ibrahim AM (2014). Spectrophotometric determination of albendazole in pure form and tablet form. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis and Medicinal Chemistry*. **2**:276-94.
- Baratta F, Germano A & Brusa P (2012). Diffusion of counterfeit drugs in developing countries and stability of galenics stored for months under different conditions of temperature and relative humidity. *Croat Med J*. **53**:173–84.
- Batrawi N, Wahdan S & Al-Rimawi FA (2017). Validated stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of amoxicillin and enrofloxacin combination in an injectable Suspension. *Sci Pharm*. **17**:85.
- Belew S, Suleman S, Wynendaele E, Hondta MD, Kosgei A, Duchateau L & Spiegeleer BD. (2018). Quality of anthelmintic medicines available in Jimma Ethiopia. *Acta Tropica*. **177**: 157–63.
- Belouafa S, Habti F, Benhar S, Belafkih B, Tayane S & Hamdouch S (2017). Statistical tools and approaches to validate analytical methods : methodology and practical examples. *International Journal of Metrology and Quality Engineering*. **8**: 1-10.
- Benner A, Machin D, Campbell MJ, Fayers PM, Alain PY & Blackwell P. (1999). Sample Size Tables for Clinical Studies. *Statistics in Medicine*. **18**: 494-95.
- Beverly DG (2014). Counterfeit drugs and medical devices in developing countries. *Research and report in tropical medicine*. **5**: 11-22.
- Blackstone EA, Fuhr JP & Pociask SMA (2014). The health and economic effect of counterfeit drugs. *American health and drug benefits*. **7**: 216-24.
- Borman P, Chatfield M, Damjanov I & Jackson P. (2009). Design and analysis of method equivalence studies. *Anal. Chem*. **81** : 9849.
- Bouadibi A. (2014). Etude Critique des Différentes Approches de Validation des Méthodes Analytiques. [Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en pharmacie] Liege : Université de Liège.
- Boyer C, Gaudin K, Kauss T, Gaubert A, Boudis A, Verschelden J *et al.* (2012). Development of NIRS method for quality control of drug combination artesunate – azithromycin for the treatment of severe malaria. *J. Pharm. Biomed. Anal*. **68** : 10–5.
- Brebion M (2014). La contrefaçon et la vente illicite du médicament. [Thèse de Doctorat pour l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie]. Rouen : Université Rouen.
- Breier AR, Garcia CV, Oppe TP, Steppe M & Schapoval EES (2002). Microbiological assay

- for azithromycin in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **29**: 957–61
- Bruton LL, Lazo JS & Parker KL. (2006). Goodman and Gilman's: the pharmacology basics of therapeutics. *Mc Graw-Hill*. Eleventh edition. Texas.
- Bukasa, T. (2013). Criminalité pharmaceutique: Kinshasa trace des pistes. <http://www.lephareonline.net/criminalite-pharmaceutique-kinshasa-trace-des-pistes/>
Copyright Le Phare. Consulté le 31 mars 2015.
- Buowari OY (2012). *Fake and counterfeit drug: a review. Afrimedical journal.* **3**: 1-4.
- Burdett V (1991). Purification and Characterization of Tet (M), a Protein That Renders Ribosomes Resistant to Tetracycline. *The Journal of Biological and Chemistry.* **266**: 2872–77.
- Burdick RK, LeBlond DJ, Sandell DH & Yang HP. (2013). Statistical Methods for Validation of Procedure Accuracy and Precision, *Pharmacopeia Forum*, **39**.
- Butt AA, Navasero CS, Thomas B, Marri SA, Katheeri HA, Thani A *et al.* (2017). Antibiotic prescription patterns for upper respiratory tract infections in the outpatient Qatari population in the private sector. *Int. J. Infect. Dis.* **55**: 20–23.
- Central Intelligence Agency (CIA) (2018). Congo, Democratic Republic. Disponible sur <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/cg.html> consulté le 26 juin 2018.
- Ceyhan M, Yildirim I, Ecevit C, Aydogan A, Ornek A, Salman N, *et al.* (2010). Inappropriate antimicrobial use in Turkish pediatric hospitals: A multicenter point prevalence survey. *Int. J. Infect. Dis.* **14**: e55-e61.
- Chandran S, Singh RSP (2007). Comparison of various international guidelines for analytical validation. *Pharmazie.* **62**: 4–14.
- Chaudhry PE & Stumpf SA (2013). The challenge of curbing counterfeit prescription drug growth: Preventing the perfect storm. *Bus. Horiz.* **56**: 189–97.
- CIM-10 FR. Classification statistique internationale des maladies et des problèmes de santé connexes. Edition 2017 en ligne sur https://www.atih.sante.fr/sites/default/files/public/content/3069/cim-10_fr_2017.pdf consulté le 05/03/2018.
- Ciza PH, Sacre PY, Waffo C, Coic L, Avohou H, Mbinze JK *et al.* (2019). Comparing the qualitative performances of handheld NIR and Raman spectrophotometers for the detection of falsified pharmaceutical products. *Talanta.* **202**: 169-78.
- Conseil National de l'Ordre des Pharmaciens (2018). Interdiction de commercialiser l'ampicilline destinée à l'administration par la voie orale. Disponible sur :

eco.net/a-la-une/rdc-interdiction-de-vente-de-lampicilline-par-voie-orale/ Consulté le 5 mai 2018.

Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, Mant D & Hay AD (2010). Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. *Bmj*. **340**: c2096.

Dadione F, Heuvelmans R, Aerden L, Hoogmartens J Adams E. (2008). Development of a liquid chromatography method for the analysis of josamycin. *J Pharm Biomed Anal*. **48**:347–55.

Darwish KM, Salama I, Mostafa S & El-Sadek M. (2013). RP-HPLC/pre-column derivatization for analysis of omeprazole, tinidazole, doxycycline and clarithromycin. *J Chromatogr Sci*. **51**:566–76.

De Bleye C (2017). Surface-enhanced Raman scattering on small molecules: Investigation of quantitative performances. [Thèse en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques] Liege : Université de Liège.

De Bleye C, Dumont E, Rozet E, Sacré P, Chavez P, Netchacovitch L *et al.* (2013). Determination of 4-aminophenol in a pharmaceutical formulation using surface enhanced Raman scattering : From development to method validation. *Talanta*. **116**: 899–905.

De-Marco BA & Salgado HN (2017). Development and validation of a green RP-HPLC method for quantification of cefadroxil capsules. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*. **6**: 2074-91.

Debrus B, Lebrun P, Kindenge JM, Lecomte F, Ceccato A & Caliaro G. (2011). Innovative high-performance liquid chromatography method development for the screening of 19 antimalarial drugs based on a generic approach , using design of experiments , independent component analysis and design space. *J. Chromatogr. A*. **1218**: 5205–15.

Dégardin K (2013). Analyse de contrefaçon de médicaments et renseignement forensique. [Thèse de doctorat en sciences forensiques]. Lausanne : Université de Lausanne.

Dégardin K, Nicole G, Guerreiro V & Roggo Y. (2016). Near Infrared spectroscopy for counterfeit detection using a large database of pharmaceutical tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal*. **10**: 16-26.

Dégardin K, Roggo Y & Margot P. (2014). Understanding and fighting the medicine counterfeit market. *J. Pharm. Biomed. Anal*. **87**: 167–75.

Deidda AR, Orlandini S & Hubert P. (2018). Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review. *J. Pharm. Biomed. Anal*. **16**: 37-50.

- Delepierre A, Gayot A, & Carpentier A (2012). Update on counterfeit antibiotics worldwide; Public health risks. *Med. Mal. Infect.* **42**: 247–55.
- Dewé W (2009). Review of statistical methodologies used to compare (bio) assays, *J. Chromatogr. B.* **877**: 2208.
- Dey S, Pradhan PK, Upadhayay UM, Shah S & Goswami K (2012). UV Spectrophotometric Determination of Cefixime in Bulk and its Dosage Form. *Journal of Pharmacy Research.* **5**: 5419-22.
- Dhal C, Ahmad FJ, Chauhan A, Jyothi M, Singh RM, Saini PK *et al.* (2015). Quality by Design Approach for Simultaneous Estimation of Doxycycline Hyclate and Curcumin by RP-HPLC Method. *Indian J Pharm Sci.* **77**:723–8.
- Dispas A, Avohou HT, Lebrun P Hubert P. (2018). Quality by Design ' approach for the analysis of impurities in pharmaceutical drug products and drug substances. *Trends in Analytical Chemistry.* **101**: 28-36.
- Djurdjevic P, Ciric A, Djurdjevic A & Stankov MJ (2009). Optimization of separation and determination of moxifloxacin and its related substances by RP-HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* **50**:117–26.
- Doerffel K (1994). Assuring trueness of analytical results, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry.* **348**: 183–87.
- Doerffel K, Herfurth G, Liebich V & Wendlandt E (1991). The shape of CUSUM – an indicator for tendencies in a time series. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry,* **341**: 519–23.
- Dowell FE, Maghirang EB, Fernandez FM, Newton PN & Green MD. (2008). Detecting counterfeit antimalarial tablets by near-infrared spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**: 1011–4.
- Duarte AC & Capelo S (2006). Application of chemometrics in separation science. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.* **29**: 1143–76.
- Ejike US & Tareka-Akpo E. (2013). Ultraviolet spectrophotometric determination of cefixime content in some pharmaceutical brands available in the Nigerian market. *An International Journal of Advances in Pharmaceutical sciences.* **6**: 2757-59.
- El-Deeb S, Atzig HW, El-Hady DA, Anger-Van CS, Griend CS & Scriba GKE (2016). Recent advances in capillary electrophoretic migration techniques for pharmaceutical analysis (2013–2015). *Electrophoresis.* **37**: 1591–1608.
- El-dien FA, Mohamed GG & Farag EY (2006). Spectrophotometric determination of flucloxacillin and dicloxacillin in pure and dosage forms. *Spectrachimica Acta Part.* **64**: 210–

5.

El-Gindy A, Attia MW, Nassar NM, Al-Abasawi M (2011). Optimization and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for determination of azithromycin and its related compounds. *J. AOAC Int.* **94**: 513-22.

El-Jardali F, Akl EA, Fadlallah R, Oliver S, Saleh N, El-Bawab L *et al.* (2015). Interventions to combat or prevent drug counterfeiting: A systematic review. *BMJ Open* **5**: 1–12.

Elkady EF & Abbas SS (2011). Development and validation of a reversed-phase column liquid chromatographic method for the determination of five cephalosporins in pharmaceutical preparations. *JAOAC Int.* **94**: 1440–6.

Elkarbane M, Al-kamarany MA, Bouchafra H, Azougagh M, Cherrah Y, Hubert P *et al.* (2015). Total error-based validation including the experimental design-based robustness evaluation of a stability-Indicating method for the simultaneous quantification of hydrochlorothiazide and valsartan in tablet formulations. *Acta Chromatographica* **27**: 195–214.

Elkhoudary M, Salam R & Hadad G (2014). Robustness testing in HPLC analysis of clarithromycin, norfloxacin, doxycycline, tinidazole and omeprazole in pharmaceutical dosage forms using experimental design. *Curr Pharm Anal.* **10**: 58–70.

Faller B & Ertl P. (2007). Computational approaches to determine drug solubility. *Adv Drug Deliv Rev.* **59**:533–45.

Fantasia HC & Vooyoys KM (2018). Public Health Implications of Counterfeit Medications. *Nurs. Womens. Health.* **22**: 264–68.

Feinberg M (2009). -LABO-STAT - Guide de validation des méthodes d'analyse. *Edition Tec & Doc Lavoisier.* **47**. Paris.

Feinberg M, Boulanger B, Dewe W & Hubert P (2004). New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. *Anal. Bioanal. Chem.* **380**: 502.

Founou RC, Founou LL & Essack SY. (2017). Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries : A systematic review and meta-analysis. *Plos one.* **12**: 1–18.

Gaudiano MC, Di-maggio A, Cocchieri E, Antoniella E, Bertocchi P, Alimonti S *et al* (2007). Medicines informal market in Congo, Burundi and Angola: counterfeit and substandard antimalarials. *Malaria Journal.* **6**: 22.

Gaudiano MC, Maggio A, Antoniella E, Valvo L, Bertocchi P, Manna L *et al* (2008). An LC method for the simultaneous screening of some common counterfeit and sub-standard antibiotics Validation and uncertainty estimation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**: 303–09.

Gaudin K, Kauss T, Gaubert A, Viaud V, Dubost JP, Olliaro P *et al.* (2011). Simultaneous Determination of Artemether and Azithromycin in Suppositories by Reversed Phase HPLC. *Anal Lett.* **44**: 2732–43.

Gavin PF & Olsen BA (2008). A quality by design approach to impurity method development for atomoxetine hydrochloride (LY139603). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46**: 431–41.

Gerbaud G & Courvalin P (1993). Characterization of a new class of tetracycline-resistance *Listeria monocytogenes gene let (S)*. *BMJ.* **10**: 27–34.

Ghanem N (2019). Substandard and falsified medicines: global and local efforts to adress a growing problem. *Clinical Pharmacist.* **11**: 5.

Gordillo MD, Blanco MA, Molero A *et al.* (1999). Solubility of the antibiotic Penicillin G in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids.* **15**: 183–90.

Gouda AA, Hashem H & Hassan W (2012). Spectrophotometric methods for determination of cefdinir in pharmaceutical formulations via derivatization with 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate and 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole. *Drug Test Anal.* **4**: 991–1000.

Grech J, Robertson J, Thomas J, Cooper G, Naunton M & Kelly T (2018). An empirical review of antimalarial quality field surveys : the importance of characterising outcomes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **147**: 612–23.

Guardabassi L & Courvalin P. (2006). Modes of Antimicrobial Action and Mechanisms of Bacterial Resistance. *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin.* **16**: 1-18.

Gunther K, Tiffany P, Ehmann D, Shapiro AB, Beth A & Basara S. (2015). Mode of inhibition of a novel DNA gyrase inhibitor with activity against *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of biological chemistry.* **15**: 633-54.

Gupta A, Ciavarella AB, Sayeed VA, Khan MA & Faustino PJ (2008). Development and application of a validated HPLC method for the analysis of dissolution samples of gabapentin drug products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46**: 181–6.

Gustavo GA & Herrador MA. (2007). Practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles, *Trends in Analytical Chemistry.* **26**: 227-38.

Habyalimana V, Mbinze JK & Yemoa AL, Waffo C, Diallo T, Tshilombo NK *et al.* (2017). Application of design space optimization strategy to the development of LC methods for simultaneous analysis of 18 antiretroviral medicines and 4 major excipients used in various pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **139**: 8–21.

Habyalimana V, Mbinze JK, Tshilombo NK, Tullio P, De, Counerotte S, Ntokamunda JK (2015). Analytical Tools and Strategic Approach to Detect Poor Quality Medicines , Identify

Unknown Components , and Timely Alerts for Appropriate Measures : Case Study of Antimalarial Medicines. *Am. J. Anal. Chem.* **6**: 977–94.

Hadi U, Van-Den-Broek P, Kolopaking EP *et al.* (2010). Cross-sectional study of availability and pharmaceutical quality of antibiotics requested with or without prescription (over the counter) in Surabaya, Indonesia. *BMC Infect Dis.* **10**: 203.

Hanaki H, Nomurab S, Akagi H (2001). Improvement of water-soluble cephalosporin derivatives having antibacterial activity against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *Chemotherapy.* **47**:170–6.

Harris J, Stevens P & Morris J (2009). Keeping it Real: Combating the spread of fakes drugs in poor countries. *International Policy Network.* Health Issues.

Hassan SS, Hayat U, Tariq I, Ahmad I, Hayat MM, Uzair M *et al.* (2014). Spectrophotometric method for the determination of Gemifloxacin mesylate in pure and tablet dosage form. *Pak J Pharm Sci.* **27**:1171–4.

Hassib ST, Farag AE & Elkady EF (2011). Liquid chromatographic and spectrophotometric methods for the determination of erythromycin stearate and trimethoprim in tablets. *Bulletin of Faculty of Pharmacy.* **49**: 81–9.

Hegazy MA, Lotfy HM & Rezk MR (2015). Novel spectrophotometric determination of chloramphenicol and dexamethasone in the presence of non labeled interfering substances using univariate methods and multivariate regression model updating. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomo-lecular Spectroscopy.* **140**: 600-13.

Höllein L, Kaale E, Mwalwisi YH, Schulze MH, Holzgrabe U (2016). Routine quality control of medicines in developing countries: Analytical challenges, regulatory infrastructures and the prevalence of counterfeit medicines in Tanzania. *Trends in analytical Chemistry.* **76**: 60-70.

Holmes AH, Moore LSP, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, Guerin PJ *et al.* (2016). Antimicrobials : access and sustainable eff ectiveness 2 Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **387**: 176-87.

Hubert C (2015). Gestion du risque associé au cycle de vie des méthodes analytiques. [*Thèse en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques*] Liege : Université de Liège.

Hubert C, Lebrun P, Houari S, Ziemons E, Rozet E & Hubert P (2014). Analysis Improvement of a stability-indicating method by Quality-by-Design versus Quality-by-Testing : A case of a learning process. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **88**: 401–9.

Hubert C, Rozet E, Ceccato A, Dewé W, Ziemons E, Moonen FK *et al.* (2007). Using tolerance intervals in pre-study validation of analytical methods to predict in-study results. The fit-for-future-purpose concept. *Journal of Chromatography A*. **1158**: 126.

Hubert P, Nguyen-huu J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N *et al* (2004). Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal — part I. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36: **579**–86.

Hubert P, Nguyen-Huu J, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon PA *et al* (2007a). Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-Part II, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45** : 70-81.

Hubert P, Nguyen-Huu J, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon PA *et al* (2007b). Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal–Part III, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**: 82–96.

Ibrahim F, Wahba MEK & Magdy G (2018). Analytical method development and validation of spectrofluorimetric and spectrophotometric determination of some antimicrobial drugs in their pharmaceuticals. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **13**: 86-128.

ICH (2005). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), November 2005. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. Consulté le 30 mars 2018.

ICH (2009). Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical Development Q8(R2) International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.

Ikeda K, Ikawa K, Ikeda A & Nishikawa Y. (2006). Short communication A simple and rapid determination of biapenem in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **844**: 148–52.

Impact (2008). Counterfeit drugs kill! Disponible sur http://www.who.int/impact/brochure/WHA_2008_apdf. Consulté le 23mars 2015.

Institut international de recherché anticontrefaçon des médicaments (IRACM) (2018). Définition de la falsification des médicaments. Disponible sur <https://www.iracm.com/falsification/definition/> consulté le 19 juin 2018.

- ISO 17025 (2017). Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais (ISO/IEC 17025:2017, Version corrigée 2018-03. Réf. n° EN ISO/IEC 17025:2017 F.
- James (2016). Grand view research, Antibiotics market size to reach \$57.0 billion by 2024, 2016. En ligne sur: <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-antibiotic-market>). Consulté le 19 octobre 2019.
- Jandera P (2011). Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review. *Analytica Chimica Acta*. **692**: 1–25.
- Javan AO, Shokouhi S & Sahraei Z (2015). A review on colistin nephrotoxicity. *Eur J Clin Pharmacol*. **71**: 801-810.
- Jing D, Wang J & Wang Y. (2010). Solubility of Penicillin Sulfoxide in Different Solvents. *J. Chem. Eng. Data*. **55**:508–50.
- Jouyban A (2008). Review of the cosolvency models for predicting solubility of drugs in water-cosolvent mixtures. *J Pharm Pharm Sci*. **11**: 32–58.
- Jun L, Nishino JLM, Tolmasky M, Ruslam IA & Zhang L (2015). Mechanisms of antibiotic resistance. *Frontiers in microbiology*. **6**: 1-3.
- Junod SW (2000). Diéthylène glycol deaths in Haiti. *Public health report*. **115**: 78-86.
- Kahsay G, Maxa J, Schepdael VA, Hoogmartens J & Adams E (2012). Development and validation of a reversed-phase liquid chromatographic method for analysis of demeclocycline and related impurities. *J Sep Sci*. **35**: 1310–8.
- Kahsay G, Shraim F, Villatte P, Rotger J, Cassus-Coussère C, Schepdael VA *et al.* (2013). Development and validation of a reversed phase liquid chromatographic method for analysis of oxytetracycline and related impurities. *J Pharm Biomed Anal*. **75**: 199–206.
- Kalonji JB (2012). Evaluation de la qualité des antipaludéens administrés per os dans la ville de Lubumbashi. [Thèse pour l'obtention du diplôme de Docteur en sciences pharmaceutiques]. Lubumbashi : Université de Lubumbashi.
- Kalonji JB, Duez P, Kabala NG, Lumani T, Byanga KJ, Faes M, Simbi LJB (2013). Evaluation de la qualité de quinine per os distribué à Lubumbashi. *Lubumbashi Médicale*. **8** : 26-9.
- Kalonji JB, Kahumba BJ, Duez P, Lumbu SJB (2012). *Analyse granulométrique des formes pulvérulentes des antipaludiques per os*. *Annales Africaines de Médecine*. **6** : 1267-73.
- Kaplan W & Mathers C (2011). The world medicines situation 2011: Health Trends: Global Burden of Disease and Pharmaceutical Needs. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

- Karlowsky JA, Nichol K & Zhanel GG (2015). Telavancin : Mechanisms of action , in vitro activity , and mechanisms of resistance. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*. **61**: 58–68.
- Karunamoorthi K (2014). The counterfeit anti-malarial is a crime against humanity : a systematic review of the scientific evidence. *Malaria Journal* **13**: 1–13.
- Kelesidis T & Falagas ME (2015). Substandard/counterfeit antimicrobial drugs. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**: 443–64.
- Kelesidis T, Kelesidis I, Rafailidis PI & Falagas ME (2007). Counterfeit or substandard antimicrobial drugs : a review of the scientific evidence. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 214–36.
- Keskar MR & Ravin MJ (2015). Spectrophotometric determination of cefixime trihydrate in pharmaceutical formulations based on ion-pair reaction with bromophenol blue. *Analytical Chemistry Insights*. **10**: 11–16.
- Khalifeh MR, Moore ND, Salameh PR (2017). Self-medication misuse in the Middle East: a systematic literature review. *Pharma Res Per.* **5**: e00323.
- Khan MH, Hatanaka K, Sovanarith T, Nivanna N, Cadena LC, Yoshida N *et al.* (2013). *Effects of packaging and storage conditions on the quality of amoxicillin-clavulanic acide-an analysis of Cambodian samples. Pharmacology and toxicology.* **14**: 33-45.
- Khuluza F, Kigera S & Heide L. (2017). Low prevalence of substandard and falsified antimalarial and antibiotic medicines in public and faith-based health facilities of southern Malawi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **96**: 1124–35.
- Khurelbalt D, Dorj G, Sunderland, Sanjjav T, Bayarsaikhan K *et al.* A cross-sectional analysis of falsified, counterfeit and substandard medicines in a low-middle income country. *BMC Public Health.* **96**: 743.
- Koczwar A & Dressman J (2017). Poor-Quality and Counterfeit Drugs: A systematic assessment of prevalence and risks based on data published from 2007 to 2016. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* **2017**: 1-9.
- Kogawa AC, Salgado HR (2013). Quantification of doxycycline hyclate in tablets by HPLC-UV method. *J Chromatogr Sci.* **51**: 919–25.
- Koissi F (2008). Contrôle de Qualité de comprimés non enrobé cas d'un générique et d'un principe de doxycycline. [Thèse en pharmacie] : Université de MOHAMMED V. Maroc
- Kringle RO (1994). An assessment of the 4-6-20 rule for acceptance of analytical runs in bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studie. *Pharmaceutical Research.* **11**: 556-60.

Krissi C (2010). Contrefaçon de médicaments et stratégies technologiques pour sécuriser la chaîne d'approvisionnement pharmaceutique. [*Mémoire pour l'obtention du diplôme de maîtrise en sciences appliquées*]. Montréal : Université de Montréal. Département de génie industriel.

Kristina M & Schmidt AH (2018). Life cycle management of analytical methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147: **506**–17.

Kumar SA, Debnath M, Rao JVL, Chaitanya B, Durga A, Ramya GPS *et al.* (2014). Rapid and sensitive RP-HPLC analytical method development & validation for estimation of rifampicin in bulk as well as in pharmaceutical formulation by using PDA Detector. *Indo Am J Pharm Res.* 4:**1561**–72.

Labi AK, Obeng-Nkrumah N, Nartey ET, Bjerrum S, Adu-Aryee NA, Ofori-Adjei YA *et al* (2018). Antibiotic use in a tertiary healthcare facility in Ghana: A point prevalence survey. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* **7**: 1–9.

Lauzon, L.P. et Hasbani, M. (2002). Analyse socio-économique de l'industrie pharmaceutique brevetée 1991-2000. en ligne : [http : www . Unites. Ugam. Ca / cese / etude _ 24 _ pharm / pharm. html](http://www.unites.ugam.ca/cese/etude_24_pharm/pharm.html) Consulté le 04 septembre 2014.

Lebrun P, Boulanger B, Debrus B, Lambert PH, Hubert PH. (2013). A Bayesian Design Space for analytical methods based on multivariate models and predictions, *J. Biopharm. Stat.* **23**: 1330.

Lee JW, Devanarayan V, Barrett YC, Weiner R, Allinson J, Fountain S *et al.* (2006). Fit-for-Purpose Method Development and Validation for Successful Biomarker Measurement. *Pharmaceutical Research.* **23** : 312-23.

Legris C. (2005). La détection des médicaments contrefaits par investigation de leur authenticité, Etude pilote sur le marché pharmaceutique illicite de la côte d'Ivoire. [*Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en pharmacie*]. Nancy : Université Henri Poin-carré.

Lehmann A, Katerere D & Dressman J (2016). Drug quality in South Africa: A field test. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* Doi: 10.1016/j.xphs.2018.06.012.

Lindg N, Hien TT, Farrar J, Singhasivanon P, White NJ & Day NPJ. (2006). A simple and rapid liquid chromatographic assay for evaluation of potentially counterfeit Tamiflu®. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **42**: 430–33.

Liu YY, Wang Y, R Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spenceret J *et al.* (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* **16**: 161–68.

Mackey TK (2018). Prevalence of substandard and falsified essential medicines still an incomplete picture. *JAMA Network Open*.**1**: e181685.

Mackey TK & Liang BA (2011). The Global Counterfeit Drug Trade : Patient Safety and *Public Health Risks*. **100**: 4571–9.

Mahmood AH, Medley GA, Grice JE, Liu X & Roberts MS (2012). Determination of trovafloxacin and marbofloxacin in sheep plasma samples by HPLC using UV detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **62**: 220–3.

Mahmoudi A, De-Francia S, Boukhechem MS & Pirro E (2016). Quantification of 3 macrolide in antibiotiques in pharmaceutical lots by HPLC: Development, validation and application to a simultaneous separation. *Br J Pharm.* 1: **63**-73.

Malathi S, Dubey R & Venkatnarayanan R. (2009). Simultaneous RP-HPLC estimation of cefpodoxime proxetil and clavulanic acid in tablets. *Indian J Pharm Sci.* **71**:102.

Marini RD (2006). Evaluation des différentes approches pour l'estimation de l'incertitude des mesures analytiques. [Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en pharmacie] Liège : Université de Liège.

Marini RD, Kindenge JM, De-María AJA, Debrus B, Lebrun P, Mantanus J *et al.* (2010). Analytical tools to fight against counterfeit medicines. *Chim. Oggi.* **28**: 10–4.

Martino R, Malet-Martino M, Gilard V & Balayssac S. (2010). Counterfeit drugs: Analytical techniques for their identification. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**: 77–92.

Mbinze JK, Sacré PY, Yemoa A, Mbay JMT, Habyalimana V, Kalenda, N., *et al.* (2015b). Ph, Marini R.D, Ziemons E (2015b). Development, validation and comparison of NIR and Raman methods for the identification and assay of poor-quality oral quinine drops, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **111**: 21-27.

Mbinze JK, Lebrun P, Debrus B, Dispas A, Mavar JM, Schofield T *et al* (2012). Application of an innovative design space optimization strategy to the development of liquid chromatographic methods to combat potentially counterfeit nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Journal of Chromatography A.* **1263**: 113-24.

Mbinze JK (2015). Développement de méthodes génériques pour le dosage des médicaments commercialisés sur le marché congolais : Utilisation de méthodes séparatives et non séparatives. [Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques]. Liège : Université de Liège.

Mbinze JK, Dispas A, Lebrun P, Tayey JM, Habyalimana V, Kalenda N *et al.* (2013). Application of an innovative design space optimization strategy to the development of LC

methods for the simultaneous screening of antibiotics to combat poor quality medicines. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **85**: 83–92.

Mbinze JK, Memvanga PB, Rozet E, Hubert P, Pr at V *et al.* (2014). Development of a liquid chromatographic method for the simultaneous quantification of curcumin, β -arteether, tetrahydrocurcumin and dihydroartemisinin. Application to lipid-based formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **88**: 447-56.

Mbinze JK, Tshilombo NK, Chavez PF, De Bleye C, Sacre PY, Mavar JTM, Hubert Ph, Marini RD, Ziemons E. (2014). La spectroscopie proche infrarouge, une technique non destructive dans la lutte contre la contrefaçon des médicaments, *Spectra Analyse.* **298**: 46-9.

Mbinze KJ, Nsangu MJ, Maghe E, Kobo S, Mwanda R, Mulumba G *et al.* (2015). Application of Total Error Strategy in Validation of Affordable and Accessible UV-Visible Spectrophotometric Methods for Quality Control of Poor Medicines. *American Journal of analytical chemistry.* **6**: 106-7.

McGann P, Snesrud E, Maybank R, Corey B, Ong AC, Clifford R *et al.* (2016). *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *bla*_{CTX-M} on a Novel IncF Plasmid: First report of *mcr1* in the USA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**: 5107.

Mediavilla JR, Patrawalla A, Chen L, Chavda KD, Mathema B, Vinnard C *et al.* (2016). Colistin- and Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *bla*_{NDM-5}, Causing a Complicated Urinary Tract Infection in a Patient from the United States. *American society for Microbiology.* **7**: 5–8.

Mendez AS, Steppe M, Schapoval EES (2003). Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. *J Pharm Biomed Anal.* **33**: 947–54.

Ministère de Santé Publique. Liste nationale des médicaments essentiels R vision Mars 2010. En ligne sur <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s18817fr/s18817fr.pdf> Consulté le 25 novembre 2013.

Moffat AC, Assi S & Watt RA. (2010). Identifying counterfeit medicines using near infrared spectroscopy. *Journal of near infrared spectroscopy.* **18**: 1-15.

Moffat AC, Osselton DM & Widdop B (2011). Clarke’s Analysis of drugs and poisons in pharmaceutical, body fluids and postmortem material. *Pharmaceutical Press.* Fourth edition. USA.

Moher D, Liberati A & Tetzlaff J. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med.* **6**: e1000097.

- Moken MC. (2003). Fake pharmaceuticals: how they and relevant legislation or lack there of contribute to consistently high and increasing drug prices. *American journal of law & medicine*. **29**: 525-42.
- Morris J & Stevens P (2009). Counterfeit medicines in less developed countries: problems and solutions. *International Policy Network*. Campaign for fighting diseases.
- Moss DM, Marzolini C, Rajoli RKR & Siccardi M. (2015). Applications of physiologically based pharmacokinetic modeling for the optimization of anti-infective therapies. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. **11**: 1203-17.
- Motwani SK, Chopra S, Ahmad FJ & Khar RK (2007). Validated spectrophotometric methods for the estimation of moxifloxacin in bulk and pharmaceutical formulations. *Spectrochim Acta - Part A*. **68**: 250–6.
- Moulin M & Coquerel A (2007). Pharmacologie. Deuxième édition. Masson. Paris.
- Mufusama JP, Ndjoko IK, Feineis D, Hoellein L, Holzgrabe U & Bringmann G (2018). Quality of the antimalarial medicine artemether - lumefantrine in eight cities of the Democratic Republic of the Congo. *Drug test Analysis*. **10**: 20-34.
- Musa H, Sule YZ & Gwarzo MS (2011). Assessment of physicochemical properties of metronidazole tablets marketed in Zaria, Nigeria. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **3**: 27-29.
- Muylaert A & Mainil JG (2012). Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Ann med vet*. **156**. 109–23.
- Mwamba TP (2017). Etude préliminaire de la contrefaçon des anti-infectieux commercialisés à Lubumbashi. [*Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies en Sciences Pharmaceutiques*]. Lubumbashi : Université de Lubumbashi.
- Mwamba TP, Amuri SB, Kaghowa ER, Mbikay DM, Impele AB, Duez P *et al.* (2015). Enquête sur la contrefaçon de quelques anti-infectieux administrés per os commercialisés dans la ville de Lubumbashi. *Pan Afr. Med. J.* **22**: 318.
- Mwamba TP, Bokanya AI, Kalonji MG, Duez P, Kalonji JB (2018). Profil de l'utilisation des antibiotiques et des pathologies infectieuses à Lubumbashi, étude rétrospective portant sur 2014-2015. *Conference à Karavia*. Lubumbashi RDC.
- Mwamba TP, Duez P, Kalonji JB (2016). Preliminary survey of counterfeiting of albendazole and metronidazole marketed in Lubumbashi. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **8**: 282-7.
- Mwamba TP, Kagoha E, Chiribagula V, Mbayo KG, Duez P & Kalonji JB (2016). Preliminary

Study on Counterfeiting of Artemether and Artesunate Marketed in Lubumbashi. *Pharmacology and Pharmacy*. **7**: 185–92.

Nagaraju K & Chowdary YA (2018). Analytical Method Development and Validation for the Simultaneous Estimation of Azithromycin and Cefixime by RP-HPLC Method in bulk and Pharmaceutical Formulations. *Int J S Res Sci. Tech.* **4**: 669-74.

Nayyar GL, Breman JG, Mackey TK, Clark JP, Hajjou M & Herrington JE (2019). Falsified and substandard drugs: stopping the pandemic. *Am J Trop Med Hyg.* **100**: 1058-65.

Nayyar GM, Breman JG, Newton PN & Herrington J (2012). Poor-quality antimalarial drugs in southeast Asia and sub-Saharan Africa. *Lancet Infect Dis.* **12**: 488-96.

Nazerli H & Hogerzeil HV (1998). The quality and stability of essential drugs in rural Zimbabwe: controlled longitudinal study. *BMJ.* **317**: 512–3.

Ndihokubwayo JB, Yahaya AA, Desta AT, Ki-Zerbo G, Assamoah EO, Keita B *et al.* (2013). *Antimicrobial resistance in the African region.* **16**: 27-30.

Newton PN, Caillet C, Guerin PJ, Guerin PJ (2017). A link between poor quality antimalarials and malaria drug resistance ?. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **14**: 531–3.

Newton PN, Lee SJ, Goodman C, Fernandez FM, Yeung S & Phanouvong S (2009). Guidelines for field surveys of the quality of medicines: A proposal. *PloS Med.* **6**: e1000052.

Newton PN, Mcgready R, Fernandez F, Green MD, Sunjio M, Bruneton C *et al* (2006). Manslaughter by Fake Artesunate in Asia — Will Africa Be Next ?. *Plos medicine.* **6**: 752-5.

Nikaido H (2009). Multidrug Resistance in Bacteria. *Annu Rev Biochem.* **78**: 119–46.

Nikolich MP, Shoemaker NB & Salyers AA (1992). A bacteroides tetracycline resistance gene represents a new class of ribosome protection tetracycline resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* **36** : 1005–12.

Nnanga N, Manga O, Loe EG *et al* (2016). Evaluation qualitative des comprimés d'Albendazole, de Mébendazole et de Praziquantel commercialisés dans les circuits formel et informel de la ville de Yaoundé. *Health Sci. Dis.* **17**: 3.

Nwokike J, Clark A & Nguyen, PP (2018). Medicines quality assurance to fight antimicrobial resistance. *Bull. World Health Organ.* **96**: 135–7.

O'Neill J (2016). Tackling drug-resistant infections globally : final report and recommendations the review on. *Review on antimicrobial resistance.*

OMS (2000). *Médicaments contrefaits, Guide pour l'élaboration de mesures visant à éliminer les médicaments contrefaits.* Département des médicaments essentiels et politique pharmaceutique. Genève.

OMS (2015). Guidelines on the conduct of surveys of the medicines. Disponible sur https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/Guidelines-on-medicines-quality-surveys-QAS15-630_30062015.pdf?ua=1. Consulté le 24 novembre 2019.

OMS (2017a). A study on the public health and socio-economic impact of substandard and falsified medical products, 2017. Disponible sur: <https://www.gph.org/images/downloads/library/who-es-socioeconomic-impact.pdf>. Consulté le 17 octobre 2018.

OMS (2017b). Global Surveillance and Monitoring System for Substandard and Falsified Medical Products. Geneva, Switzerland :

OMS (2017c). Stratégie de coopération de l'OMS avec le pays République Démocratique du Congo 2017-2021. Disponible sur : <https://www.who.int/emergencies/crises/cod/rdc-css-2017-2021.pdf?ua> consulté le 10 décembre 2018.

OMS (2010). Rapport du groupe spécial régional sur la lutte contre les produits médicaux de qualité inférieure, faux/faussement étiquetés/falsifiés/contrefaits dans la région africaine de l'OMS. *Comité régional de l'Afrique*. 60ème session. Malabo. 2010. Rapport n° AFR/RC60/16. http://www.who.int/medicines/regulation/ssffc/publications/GSMS_Report.pdf Consulté le 10 Février 2018.

Oral V & Andaç, S. Ç. (2015). A literature review of analytical methods used for identification and determination of counterfeit drugs. *İstanbul Ecz. Fak. Derg. / J. Fac. Pharm Istanbul*. **45**: 253–66.

Ostrowsky B, Banerjee R, Bonomo RA, Cosgrove SE, Davidson L, Doron S *et al.* (2018). Infectious Diseases Physicians: Leading the Way in Antimicrobial Stewardship. *Clin. Infect. Dis.* **66**: 995–1003.

Ozawa S, Evans DR, Bessias S, Haynie DG, Yemeke TT, Laing SK *et al.* (2018). Prevalence and Estimated Economic Burden of Substandard and Falsified Medicines in Low- and Middle-Income Countries. *JAMA Netw. Open*. **1**: e181662.

Ozawa S, Evans DR, Higgins CR, Laing SK & Awor P (2019). Development of an agent-based model to assess the impact of substandard and falsified antimalarials: Uganda case study. *Malar J.* **18**: 5.

Peddicord MB, Pathirana C, Shackman HM, Bolga MS & Miller SA (2014). Application of mass spectrometry to support verification and characterization of counterfeit pharmaceuticals.

Special issues. 8-15. En ligne sur <http://portail.umons.ac.be/FR/universite/facultes/fmp/services/chimtherap/Pages/default.aspx> Consulté le 24 mars 2014.

Penchev P. (2010). Etude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. [Thèse du Doctorat en Génie des procédés et de l'environnement] Toulouse : Université de Toulouse.

Pennaforte S (1999). La contrefaçon des médicaments. [Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en pharmacie]. Paris : Université Paris V – René Descartes.

Peraman R, Bhadraya K & Reddy YP (2015). Analytical quality by design: A tool for regulatory flexibility and robust analytics. *International Journal of Analytical Chemistry*. **10**: 55-67.

Peyraud N, Rafael F, Parker LA, Quere M, Alcoba G, Korff C *et al.* (2017). An epidemic of dystonic reactions in central Africa. *Lancet Glob. Heal.* **5**: e137–8.

Pharmacopée Européenne (2016). Pharmacopée Européenne, huitième édition. *Conseil de l'Europe*, Strasbourg.

Pharmacopée Européenne (2020). Essais de Pharmacotechnie. Version 10.0 Chap II. 9.40.

Pharmacopée internationale (2018). International Pharmacopoeia - Six Edition, 2018. <http://apps.who.int/phint/en/p/about/>. Consulté le 30 juin 2018.

Phoba MF, DeBoeck H, Ifeka BB, Dawili J, Lunguya O, Vanhoof R *et al.* (2014). Epidemic increase in Salmonella bloodstream infection in children, Bwamanda, the Democratic Republic of Congo. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**: 79–87.

Platzer DJ, White BA (2006). Development and validation of a gradient HPLC method for the determination of clindamycin and related compounds in a novel tablet formulation. *J Pharm Biomed Anal.* **41**: 84–8.

Poehlsgaard J & Douthwaite, S. (2005). The bacterial ribosome as a target for the antibiotics. *Nature reviews microbiology*. **3** : 870-81.

Programme National d'Approvisionnement en Médicament (PNAM). (2008). Cartographie des systèmes d'approvisionnement et de distribution des médicaments et autres produits de santé en RDC. Organisation Mondiale de la Santé.

RADIOOKAPI. (2013). RDC: le gouvernement ferme 3 usines pharmaceutiques à Kinshasa. Disponible sur <https://www.radiookapi.net/actualite/2013/07/05/rdc-le-gouvernement-ferme-3-usines-pharmaceutiques-kinshasa>. Consulté le 31 mars 2015.

- RADIOOKAPI. (2018). Kinshasa : incinération des faux médicaments. Disponible sur <https://www.radiookapi.net/2018/02/13/emissions/okapi-service/kinshasa-incineration-des-faux-medicaments>. Consulté le 13 juin 2018
- Rafamantanana MH, Debrus B, Raelison GE, Rozet E, Lebrun P, Uverg-ratsimamanga S *et al.* (2012). Application of design of experiments and design space methodology for the HPLC-UV separation optimization of aporphine alkaloids from leaves of *Spirospermum penduliflorum* Thouars. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **62**: 23–32.
- Ramadan AZ, Mandil H & Dahhan M (2013). Spectrophotometric determination of cefixime in pure form and in Syrian pharmaceuticals through complexation with Cu (II). *Asian Journal of Chemistry.* **25**: 3457-62.
- Rasheed H, Höllein L & Holzgrabe U (2018). Future information technology tools for fighting substandard and falsified medicines in low- and middle-income countries. *Front. Pharmacol.* **9**: 1–7.
- Rattanapoltaveechai R, Vongkom W, Suntornsuk W & Suntornsuk L (2007). Simple and rapid spectrophotometric method for the analysis of erythromycin in pharmaceutical dosage forms. *Journal of Food and Drug Analysis.* **15**: 10-4.
- Razzaq SN, Khan IU, Mariam I, Razzaq SS (2012). Stability indicating HPLC method for the simultaneous determination of moxifloxacin and prednisolone in pharmaceutical formulations. *Chem Cent J.* **6**: 438.
- Rebiere H, Guinot P, Chauvey D, & Brenier C. (2017). Analysis Fighting falsified medicines : The analytical approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **142**: 286–306.
- Ribet J (2003). Fonctionnalisation des excipients : Application à la comprimabilité des celluloses et des saccharoses. [Thèse d'Etat, Faculté de Pharmacie] : Université de Limoges.
- Rius A, Ruisanchez I, Callao MP & Rius FX (1998). Reliability of analytical systems: use of control charts, time series models and recurrent neural networks (RNN). *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* **40**: 1–18.
- Robert JA, Hons BP, Kruger P, Paterson DL & Lipman J (2008). Antibiotic resistance—What's dosing got to do with it?. *Crit Care Med.* **36**: 2433–40.
- Robin, E. (2013). Place du Pharmacien officinal dans la lutte contre les contrefaçons de médicaments. [Thèse du Doctorat en Pharmacie]. Nantes : Université de Nantes.
- Rocher, L (2014). La contrefaçon des médicaments dans le monde : situation actuelle et perspectives. [Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en pharmacie]. Lyon : Université Claude –Bernard.

- Rodionova YO, Titova AV, Balyklova KS, Pomerantsev AL (2019). Detection of counterfeit and substandard tablets using non-invasive NIR and chemometrics- A conceptual framework for a big screening system. *Talanta*. **205**: 120–50.
- Rouessac F, Rouessac A & Cruche D (2004). Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes. *Dunod*. sixième édition. Paris.
- Rozet E (2008). Improvement of the predictive character of test results issued from Analytical methods life cycle. [Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en pharmacie] Liege : Université de Liège.
- Rozet E, Lebrun P, Debrus B, Boulanger B & Hubert P (2013). Design Spaces for analytical methods. *TrAC Trends Anal. Chem.* **42**: 157.
- Rozet E, Ziemons E, Marini RD, Boulanger B & Hubert P (2013). Analytica chimica acta methodology for the validation of analytical methods involved in uniformity of dosage units tests. *Anal. Chim. Acta.* **760**: 46–52.
- Rufino JL, Pezza HR & Pezza L (2008). Flow-injection spectrophotometric determination of azithromycin in pharmaceutical formulations using p-chloranil in the presence of hydrogen peroxide. *Anal Sci.* **24**: 871–6.
- Sacré P, Deconinck E, Saerens L, Beer TD, Courselle P, Vancauwenberghe R *et al.* (2011). Detection of counterfeit Viagra ® by Raman microspectroscopy imaging and multivariate analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **56**: 454–61.
- Sacré PY (2011). Analytical strategies for the detection of counterfeit dysfunctional drugs. [Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en pharmacie] Liège : Université de Liège.
- Sadarangani SP, Estes LL & Steekelberg JM (2015). Non-anti-infective effect of antimicrobials and their clinical applications: a review. *Mayo clinic proceedings.* **90**: 109-27.
- Saha U, Sen K & Das T.K. (1990). Spectrophotometric determination of tetracyclines in pharmaceutical preparation, with urbanyl acetate. *Talanta.* **37**: 1193-6.
- Sahoo DR & Jain SA (2016). Rapid and validated RP-HPLC method for the simultaneous quantification of benzoic acid, metronidazole and miconazole nitrate in vaginal formulations. *J Chromatogr Sci.* **54**:1613–8.
- Saini K, Saini N & Baldi A (2011). Impact of anticounterfeiting trade agreement on pharma sector: a global perspective. *Journal of Current Pharmaceutical Research.* **6**: 4-10.
- Sajonz P, Natishan TK, Wu Y, McGachy NT & DeTora D (2005). Development and validation of a sensitive and robust wipe-test method for the detection and quantification of the antibiotic ertapenem and its primary degradates in a pharmaceutical manufacturing environment. *J. Liq.*

Chromatogr. Relat. Technol. **28**: 713–25.

Salem H (2004). Selective spectrophotometric determination of phenolic β -lactam antibacterial agents in pure forms and in their pharmaceutical formulations. *Anal Chim Acta.* **515**: 333–41.

Salem H & Saleh G (2002). Selective spectrophotometric determination of phenolic beta-lactam antibacterial agents. *J Pharm Biomed Anal.* **28**: 1205–13.

Samanidou VF, Hapeshi EA & Papadoyannis IN (2003). Rapid and sensitive high performance liquid chromatographic determination of four cephalosporin antibiotics in pharmaceuticals and body fluids. *J. Chromatogr. B.* **788**: 147–58.

Sanli S, Sanli N, Gumustas M, Ozkan SA, Karadas N & Aboul-Enein HY (2011). Simultaneous estimation of ceftazidime and ceftizoxime in pharmaceutical formulations by HPLC method. *Chromatographia.* **74**: 549–58.

Savage SL (2009). *The Flaw of Average: Why we underestimate risk in the face of uncertainty*, Wiley, Hoboken.

Schäfermann S, Wemakor E, Hauk C & Heide L (2018). Quality of medicines in southern Togo: Investigation of antibiotics and of medicines for non-communicable diseases from pharmacies and informal vendors. *PLoS ONE.* **13**: e0207911.

Schäfermann S, Neci R, Ndze E, Nyaah F, Pondo V & Heide L (2020). Availability, prices and affordability of selected antibiotics and medicines against non-communicable diseases in western Cameroon and northeast DR Congo. *PLoS One* **15**: e0227515.

Schiavetti B, Wynendaele E, Spiegeleer B, Mbinze J, Kalenda N, Marini R *et al.* (2018). The quality of medicines used in children and supplied by private pharmaceutical wholesalers in Kinshasa, Democratic Republic of Congo: A prospective survey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **98**: 894–903.

Schneider M & Nam N (2020). Africa and counterfeit pharmaceuticals in the times of COVID-19. *Journal of Intellectual Property Law & Practic.* **0**: 1-2.

Schweitzer MG, Pohl M, Hanna-Brown, M, Nethercote P, Borman P, Hansen G *et al* (2010). Implication and opportunities of applying QbD principles to analytical measurements. *Pharma Tech.* **34** : 52-9.

Segura AP (2009). Développement de techniques analytiques pour la détermination des agents anti-infectieux dans les eaux environnementales. [*Thèse de Doctorat en Chimie*]. Montréal : Université de Montréal.

Sengaloundeth S, Green MD, Fernández FM, Manolin O, Phommavong K, Insixiengmay V *et al* (2009). A stratified random survey of the proportion of poor quality oral artesunate sold at

medicine outlets in the Lao PDR – implications for therapeutic failure and drug resistance. **25**: 1–10.

Servais AC (2005). Séparation et dosage de substances médicamenteuses par électrophorèse capillaire en milieux non aqueux : influence de l'utilisation simultanée d'une cyclodextrine et d'un agent d'appariement d'ions, [Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en pharmacie] Liège : Université de Liège.

Shah NA, Sattigeri BM, Patel NN & Desai HA. (2015). Counterfeit drugs in India: significance and impact on pharmacovigilance. *International Journal of Research in Medical Sciences*. **3**: 2156-60.

Shaikh KA, Patil SD & Devkhile AB (2008). Development and validation of a reversed-phase HPLC method for simultaneous estimation of ambroxol hydrochloride and azithromycin in tablet dosage form. *J Pharm Biomed Anal*. **48**: 1481–4.

Shakoor O, Taylor RB & Behrens RH (1997). Assessment of the incidence of substandard drugs in developing countries. *Trop Med Int Health*. **2**: 839–45.

Sharif S, Khan IU, Ashfaq MI, Iqba MS & Ahmad S (2010). Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of potassium clavulanate and cefadroxil in synthetically prepared tablets. *Journal of Analytical Chemistry*. **65**: 1029–34.

Shewiyo DH, Kaale E, Risha PG, Dejaegher B, Beer J & Smeyers-Verbeke J (2013). Accuracy profiles assessing the validity for routine use of high-performance thin-layer chromatographic assays for drug formulations. *J. Chromatogr. A*. **1293**: 159–69.

Simon MO & Li CJ (2012). Green chemistry oriented organic synthesis in water. *Chem Soc Rev*. **41**: 1415–27.

Skoog DA & Holler FJ & Crouch SR (2007). Principle's analysis. *Thomson Brooks/Cole Publishing*. Sixth Belmont.

Smyrniotakis CG & Archontaki HA (2007). C18 columns for the simultaneous determination of oxytetracycline and its related substances by reversed-phase high performance liquid chromatography and UV detection. *J Pharm Biomed Anal*. **43**: 506–14.

Soares MG, Figueiredo LC, Faveri M, Cortelli SC & Duarte M (2011). Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J Appl Oral Sci*. **20**: 295–309.

Souza MJ, Canedo NA, Souza S, Filho PS & Bergold AM (2009). Development of an ultraviolet spectrophotometric method for the determination of ceftiofur sodium powder. *J*

AOAC Int. **92**: 1673–80.

Suard C (2007). Consommation des antibiotiques dans des hôpitaux suisses : investigation d'un système de surveillance. [*Diplôme d'étude supérieure spécialisée en pharmacie hospitalière*]. Genève : Université de Genève.

Subirats X, Rosés M, Bosch E (2007). On the effect of organic solvent composition on the pH of buffered HPLC mobile phases and the pK of Analytes—a review. *Separation & Purification Reviews*. **36**: 231-55.

Tadesse BT, Ashley EA, Ongarello S, Havumaki J, Wijegoonewardena M, González IJ *et al* (2017). Antimicrobial resistance in Africa: A systematic review. *BMC Infect. Dis.* **17**: 1–17.

Tandem GS & Nnanga NE (2014). Quality control evaluation of brands of mebendazole 100 mg tablets on the illegitimate pharmacy outlets. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **6**: 355-7.

Tavakoli N, Varshosaz J, Dorkoosh F & Zargarzadeh MR (2007). Development and validation of a simple HPLC method for simultaneous in vitro determination of amoxicillin and metronidazole at single wavelength. *J Pharm Biomed Anal.* **43**: 325–9.

Tie Y, Vanheea C, Deconincka E & Adams E. (2018). Development and validation of chromatographic methods for screening and subsequent quantification of Suspected illegal antimicrobial drugs encountered on the Belgian market. *Talanta*. **194**: 876–87.

Tie Y, Vanheea C, Deconincka E & Adams E (2019). The role of liquid chromatography in the analysis of illegal medicine and health products. *LCGC Europe*. **32**: 88-93.

Tshilombo NK, Hamuli PC, Mbinze JK, Habyalimana V, Kalenda DT, Mwamba TP *et al.* (2018). Investigation of the quality of antibiotics-based amoxicillin for monitoring of some different medicine markets of Democratic Republic of Congo. *Am. J. Anal. Chem.* **09**: 366–85.

Turel I (2002). The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. *Coord Chem Rev.* **232**:27–47.

USP. (2018). USP-NF Online Login. <http://www.uspnf.com/uspnf/login>. Consulté le 20 avril 2018

Varanda F, Melo MJ & Caço AI. (2006) Solubility of antibiotics in different solvents. Hydrochloride Forms of Tetracycline, Moxifloxacin, and Ciprofloxacin. *Ind. Eng. Chem. Res.* **45**: 6368-74.

Venugopal K, Snehalatha M, Bende G & Saha R (2007). Development and validation of an ion-pairing RP-HPLC method for the estimation of gatifloxacin in bulk and formulations. *J Chromatogr Sci.* **45**: 220–5.

Verdier M C (2018). Pharmacologie des antiinfectieux. Société Française de Pharmacologie. Elsevier Masson. 1^{ère} édition. Paris.

Vickers S, Bernier M, Zambrzycki S, Fernandez FM, Newton PN & Caillet C. (2018). Field detection devices for screening the quality of medicines : a systematic review. *BMJ Glob Health*. **3**: e000725.

Vogt FG & Kord, A. S. (2011). Development of quality-by-design analytical methods.. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **100**: 797–812.

Wafula F, Dolinger A, Daniels B & Mwaura N. (2017). Examining the quality of medicines at Kenyan healthcare facilities : A validation of an alternative post-market surveillance model that uses standardized patients. *Drugs - Real World Outcomes* **4**: 53–63.

Wankhade R, Bhalerao S, Panchory H, Pundir A & Pradhan R (2012). Analysis of erythromycin and benzoyl peroxide in combined dosage form by UV visible spectrophotometry. *Int J Pharm Pharm Sci*. **4**: 527-31.

Wei T, Wang C & Du S (2015). Measurement and Correlation of the solubility of penicillin V potassium in ethanol + water and 1-butyl alcohol + water systems. *J. Chem.Eng. Data*. **24**: e50084.

Welch CJ, Brkovic T & Schafer W. (2009). Performance to burn? Re-evaluating the choice of acetonitrile as the platform solvent for analytical HPLC. *GreenChem*. **11**: 1232–8.

Wertheimer AI, Chaney NM, Santella T (2009). Counterfeit pharmaceuticals: current statut and future projection. *Journal of the American Pharmacists Association*. **6**: 710-7.

Wilczynski S (2015). The use of dynamic thermal analysis to distinguish between genuine and counterfeit drugs. *International journal of pharmaceutics*. **490**: 16-21.

Yemoa A, Habyalimana V, Mbinze JK, Crickboom V, Ngoya A, Sacré P *et al.* (2017). Detection of poor quality artemisinin-based combination therapy (ACT) medicines marketed in Benin using simple and advanced techniques. *Current drug safety*. **12**: 178–86.

Yu P, Jie L, Yufeng W, Yuanyuan S & Shengfenwang YZ. (2013). Study of rifampicin monoresistance mechanism in Mycobacterium Tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **57**: 893-900.

Zalewski P, Skibiński R, Cielecka-Piontek J, Bednarek-Rajewska K. (2014). Development and validation of stability-indicating HPLC method for determination of cefpirome sulfate. *Acta Pol Pharm*. **71**: 731–6.

Zalewski P, Garbacki P, Cielecka-Piontek, J, Bednarek-Rajewska K & Krause A (2015).

Development and validation of the stability-indicating LC-UV method for determination of cefozopran hydrochloride. *Acta Pol Pharm - Drug Res.* **72**: 423–7.

Zhang CL & Wang Y (2008). Aqueous solubilities for ofloxacin, norfloxacin, lomefloxacin, ciprofloxacin, pefloxacin, and pipemidic acid from (293.15 to 323.15). *J. Chem. Eng. Data.* **53**: 1295–7.

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE I

FICHE DE PRELEVEMENT

*I. Informations sur le lieu de collecte*Ville Nom de l'établissement Cité Etablissement a-t-il une licence? type d'établissement de vente Il y a-t-il un pharmacien? Adresse *II. Informations sur l'échantillon collecté*DCI Le produit est enregistré? Nom de marque N° d'enregistrement Forme galénique N° de lot Dosage Date d'expiration Est ce le produit importé? Date de fabrication Pays de provenance Prix par unité (E) Nom de fabricant Quantité collectée Date de collecte

ANNEXE II : FICHE DE PRELEVEMENT DE TEMPERATURE

Date	Prélèvement matin	Prélèvement après midi	Moyenne journalière	Nom et Signature
	T°	T°	T°	
03/03/2038	20	22		
02/03/2038	21	24		
03/03/2038	21	24		
04/03/2038	21	24		
05/03/2038	20	23		
06/03/2038	19	25		
07/03/2038	19	25		
08/03/2038	20	25		
09/03/2038	19	23		
10/03/2038	19	23		
11/03/2038	19	23		
12/03/2038	21	24		
13/03/2038	19	24		
14/03/2038	20	24		
15/03/2038	20	24		
16/03/2038	21	24		
17/03/2038	21	25		
18/03/2038	19	25		
19/03/2038	19	23		
20/03/2038	20	23		
21/03/2038	20	23		
22/03/2038	20	22		
23/03/2038	20	21		
24/03/2038	21	21		
25/03/2038	22	22		
26/03/2038	19	23		
27/03/2038	20	23		
28/03/2038	20	23		
29/03/2038	19	25		
30/03/2038	20	25		
31/03/2038	19	23		

ANNEXE III : FICHE D'INSPECTION VISUELLE

No. ID de l'échantillon _____		No. Boite inspectée (ex. 1/5) _____		Date de l'inspection ___/___/___		
<input type="checkbox"/> Arthéméther/luméfrantrine <input type="checkbox"/> amoxicilline <input type="checkbox"/> paracétamol No. Lot _____						
EMBALLAGE SECONDAIRE				Détails	Validé	Détails
1	Le médicament est-il protégé par un emballage secondaire ?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
2	L'emballage secondaire est-il intègre ?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
3	L'emballage secondaire assure-t-il la protection du médicament et peut-il être bien fermé ?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Les informations suivantes sont-elles imprimées sur l'emballage secondaire :						
4	Nom commercial du produit	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
5	Dénomination commune internationale du produit	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
6	Dosage par unité (pour les sirops : dosage par volume de dose)	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
7	Nombre d'unités contenues (pour les sirops : volume total)	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
8	Forme (ex. poudre pour suspension ; tablettes)	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
9	Numéro de la licence AMM (si étranger aussi)	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
10	Nom et adresse du propriétaire de l'AMM	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
11	Nom et adresse du fabricant (manufactured by ; fabriqué par)	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
12	Date de fabrication	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
13	Date d'expiration	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
14	Numéro du lot (si écrit mais à l'intérieur, notifiez « interne » é dans le détail)	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
15	Information sur la conservation du produit	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
16	Liste des excipients à effet notoire	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
17	Les informations sont-elles lisibles ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
18	Les informations sont-elles correctement orthographiées	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
19	Les informations sont-elles imprimées de manière indélébile	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
EMBALLAGE PRIMAIRE				Détails	Validé	Détails
20	L'emballage primaire est-il intègre ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
21	L'emballage primaire isole-t-il le médicament de l'extérieure et est-il hermétique ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
22	L'emballage primaire est-il scellé convenablement ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
23	L'emballage primaire est-il exempt de traces d'humidité	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Les informations suivantes sont-elles imprimées sur l'emballage primaire :						
24	Nom commercial du produit	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
25	Dénomination commune internationale du produit	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
26	Dosage par unité (pour les sirops : dosage par volume de dose)	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
27	Forme (ex. poudre pour suspension ; tablettes)	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
28	Numéro de la licence AMM (si étranger aussi)	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
29	Nom et adresse du propriétaire de l'AMM	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
30	Nom et adresse du fabricant (manufactured by ; fabriqué par)	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
31	Date de fabrication	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
32	Date d'expiration	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
33	Numéro du lot	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
34	Les informations sont-elles lisibles ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	

35	Les informations sont-elles correctement orthographiées	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
36	Les informations sont-elles imprimées de manière indélébile	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
NOTICE				Détails	Validé	Détails
37	Le produit est-il accompagné d'une notice ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
38	Les informations sont-elles lisibles ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
39	La langue utilisée est-elle officielle du pays où le produit est vendu (français)	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
40	Le produit, avec ce nom commercial et dans ce dosage et formulation, est-il dument enregistré en RDC ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Les informations suivantes sont-elles fournies dans la notice				Détails	Validé	Détails
41	Indications	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
42	Contre-indications	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
43	Utilisation (fréquence, dosage, route d'administration)	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
44	Mode d'administration	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
45	Effets secondaires	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
46	Interactions	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
47	Précautions	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
48	Composition complète du produit (quali-quantitative)	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
49	Précautions de stockage	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
50	Si pas dans la notice, sont-elles fournies : dans l'emballage secondaire <input type="checkbox"/> dans l'emballage primaire <input type="checkbox"/>					
51	Si elles sont dans une des emballages, sont-elles complètes ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
52	Les informations sur l'emballage secondaire, sur l'emballage primaire, dans la notice et par rapport au contenu, correspondent-elles ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
APPAREANCE PHYSIQUE DE COMPRIMÉS				Détails	Validé	Détails
53	Les comprimés ont-elles la même forme ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
54	Les comprimés ont-elles la même dimension ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
55	Les comprimés ont-elles la même couleur ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
56	Les comprimés sont-elles lisses, exemptes des résidus poudreux et non-poisseux ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
57	Les inscriptions portées sur la surface des comprimés (lettres, chiffres) sont-elles uniformes et identiques ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
58	Les comprimés sont-elles exemptes de fissures, trous, érosion ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
59	La surface des comprimés est-elle exempte de corps étrangers, macules, contamination ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
60	Le blister, manque-t-il des comprimés ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
APPAREANCE PHYSIQUE DE POUDRES DE SUSPENSIONS				Détails	Validé	Détails
61	L'emballage primaire (bouteille) présente-t-il un trait pour la resuspension de la poudre ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
62	Est qu'un doseur est fourni avec le produit pour assurer le dosage correct ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
63	La poudre pour suspension a-t-elle une couleur homogène ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
64	La poudre pour suspension est-elle exempte des grumeaux ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
65	La poudre pour suspension est-elle exempte d'un aspect poisseux ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
66	La fermeture de la bouteille est-elle du type sécurisé pour les enfants ?	Oui <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
67	La bouteille est-elle : transparente <input type="checkbox"/> opaque <input type="checkbox"/> ambré <input type="checkbox"/>					
68	La bouteille est-elle : en verre <input type="checkbox"/> en plastique <input type="checkbox"/>					

Date / /
Date / /
Date / /

Nom inspecteur DPM
Nom encodeur
Nom analyste

Signature

ANNEXE IV: LETTRE DESTINEE AUX FABRICANTS

Dear Manufacturer

I'm pleased to contact you in the frame of my scientific research regarding the quality medicines situation in DRC, city of Lubumbashi where I live. I have collected some samples on different market and I would like to verify whether some information that I found on the primary and secondary packaging are accurate. I do not have any other way to obtain them.

These information are:

- The name of the manufacturer,

The address

The batch number

The manufacturing date and

-the expiry date

Could provide me with these information? You will find attached the pictures of the concerning samples.

Thanking you for your attention,

ANNEXE V: LISTE DES ADRESSES ET EMAILS DES FABRICANTS

ECH	Email du fabricant	Adresse du fabricant
AZT1	info@mepro pharmaceuticals.com	Q Road, Phase IV, G.I.D.C, Wadhwan City, Surendranagar, Gujarat, India
AZT2	à contacter par mail à partir du site du fabricant	J-214/215, M.I.D.C, Tarapur, biosiar-401506-dist-thane, maha-htra
AZT3	ITA.AEReporting@pfizer.com	haupt pharma latina, 156 km 47600 borgo, Italie
AZT4	Mohamed.Elaidouni@pfizer.com	Km 0.500, route de Oualidia, BP 35,24000 El Jadida
AZT5	à contacter par mail à partir du site du fabricant	Plot No. 696, New baganoyo, Road mwenge
AZT6	à contacter par mail à partir du site du fabricant	division of pfizer inc ny 10017 usa
AZT7	à contacter par mail à partir du site du fabricant	division of pfizer inc ny 10017 usa
AZT8	à contacter par mail à partir du site du fabricant	7155, Av. G1 bobozo, kingabwa, kinshasa
AZT9	à contacter par mail à partir du site du fabricant	7155, G1 bobozo, kingabwa, kinshasa
AZT10	info@meyer.co.in	A-177,Wagle Estate, thane-
AZT11	à contacter par mail à partir du site du fabricant	J-214/215, M.I.D.C, Tarapur, biosiar-401506-dist-thane, Maha-htra
AZT12	à contacter par mail à partir du site du fabricant	Plot No. 696, New baganoyo, Road mwenge
AZT13	à contacter par mail à partir du site du fabricant	7155, G1 bobozo, kingabwa, kinshasa
AZT14	info@meyer.co.in	A-177,Wagle Estate, thane-400604. (Mumbai)
AZT15	à contacter par mail à partir du site du fabricant	7155, Av. G1 bobozo, kingabwa, kinshasa
CFD1	à contacter par mail à partir du site du fabricant	3, joseph monier bp 325
CFD2	à contacter par mail à partir du site du fabricant	3, joseph monier bp 325
CFD3	à contacter par mail à partir du site du fabricant	B-21/22 , MIDC Area, Kalmeshwar
CFD4	à contacter par mail à partir du site du fabricant	At: 8, 9 Dewan et Sons Udyog Nagar, Palghar-401404, Maha-htra
CFD5	à contacter par mail à partir du site du fabricant	b-21/22 , MIDC Area, Kalmeshwar
CFD6	à contacter par mail à partir du site du fabricant	13,A et C Industrial Maxi road, Ujjian (MP)

ECH	Email du fabricant	Adresse du fabricant
CFD7	info@sancepharma.com	2, kozhuvanal, pala, kottayam-686573,kerala,
CFD8	info@zestpharma.in	275, sector F, Sanwer road
CFD9	info@zestpharma.in	275, sector F, Sanwer road
CFD1 0	info@sancepharma.com	2, kozhuvanal, pala, kottayam-686573,kerala,
CFD1 1	RAS	275, sector F, Sanwer road
CFD1 2	à contacter par mail à partir du site du fabricant	3, joseph monier bp 325
CFD1 3	à contacter par mail à partir du site du fabricant	At: 8, 9 Dewan et Sons Udyog Nagar, Palghar-401404, Maha-htra
CFD1 4	à contacter par mail à partir du site du fabricant	3, joseph monier bp 325
CFD1 5	info@pharmamfg.in	c/8, sardar estate, ajwa road, baroda-390019, gujarat
CFD1 6	info@sancepharma.com	2, kozhuvanal, pala, kottayam-686573,kerala,
CFD1 7	info@pharmamfg.in	c/8, sardar estate, ajwa road, baroda-390019, gujarat
CHL 1	info@stridesarco.com	Plot No. 9-12, Dewan & Sons Indl. Area, Veroor, Palghar,
CHL 2	Prashipharma@gmail.com	
CHL 3	sdxekt_zhoulei@163.com	xinyan Town, yanzhou city, shandong province
CHL 4	info@farmasino.com	100, jianye road, nanjing (210004
CHL 5	info@farmasino.com	100, jianye road, nanjing (210004
CHL 6	Prashipharma@gmail.com	
CHL 7	sdxekt_zhoulei@163.com	xinyan Town, yanzhou city, shandong province
CHL 8	Pas disponible	
CHL 9	Prashipharma@gmail.com	
ERH 1	Pas disponible	1210, madrandele, limete
ERH 2	Pas disponible	1007, del'ouest-kingabwa
ERH 3	works@atrpharma.com	H – 19, MIDC Waluj, Aurangabad-431133

ECH	Email du fabricant	Adresse du fabricant
ERH 4	works@atrapharma.com	H – 19, MIDC Waluj, Aurangabad-431133
ERH 5	Prashipharma@gmail.com	
ERH 6	Prashipharma@gmail.com	
ERH 7	info@astralifecare.com	plot n°57/p sarthay-barva Highway post radoda-382220 taluka
ERH 12	contacter par mail à partir du site du fabricant	
ERH 13	à contacter par mail à partir du site du fabricant	
ERH 8	works@atrapharma.com	H – 19, MIDC Waluj, Aurangabad-431133
ERH 14	Pas disponible	1007, del'ouest-kingabwa
ERH 15	Pas disponible	
ERH 9	works@atrapharma.com	H – 19, MIDC Waluj, Aurangabad-431133
ERH 10	info@astralifecare.com	plot n°57/p sarthay-barva Highway post radoda-382220 taluka
ERH 11	Pas disponible	1210, madrandele, limete
ERH 16	à contacter par mail à partir du site du fabricant	
ERH 17	à contacter par mail à partir du site du fabricant	
TRC1	Prashipharma@gmail.com	
TRC2	Pas disponible	11, huitong road, jinzhong city, shanxi provine
TRC3	à contacter par mail à partir du site du fabricant ou Longwang@saintsun.net	420, shangyuan street, nanjing
TRC4	info@farmasino.com	100, jianye road, nanjing (210004
TRC5	à contacter par mail à partir du site du fabricant ou Longwang@saintsun.net	420, shangyuan street, nanjing
TRC6	info@farmasino.com	100, jianye road, nanjing (210004
TRC7	Pas disponible	11, huitong road, jinzhong city, shanxi provine
TRC8	Prashipharma@gmail.com	Gut no – 982/6 983/6 Juna Satpati Road, Village Shirgaon, Taluka Palgar

ECH	Email du fabricant	Adresse du fabricant
CFX1	info@associatedbiotech.com	Village kishanpura, guru majra road, nalagarh road, baddi, distt, solan, Himachal Pradesh
CFX2	info@associatedbiotech.com	Baddi, Distt. Solan -174101, H.P
CFX3	Pas disponible	dhaka unit, kaliakour, gazipur
CFX4	info@swisspharma.in	3709, GIDC, phase IV Vatva, Ahmedabad-3
CFX5	corporate@emcure.co.in	Hinjwardi, pune 411057
CFX6	Pas disponible	
CFX7	à contacter par mail à partir du site du fabricant	29, av charles de gaule 69230 Saint Genis Laval-France
CFX8	à contacter par mail à partir du site du fabricant	29, av charles de gaule 69230 Saint Genis Laval-France
CFX9	info@swisspharma.in	3709, GIDC, phase IV Vatva, Ahmedabad-382445, Gujarat
CFX1	corporate@emcure.co.in	Hinjwardi, pune 411057
0		
CFX1	briskonlaboratories@yahoo.co.in	plot n°11, survey 239, Kothariya, Rajkot-36022, Gujjarat
1		
CFX1	briskonlaboratories@yahoo.co.in	plot n°11, survey 239, Kothariya, Rajkot-36022, Gujjarat
2		
CFX1	à contacter par mail à partir du site du fabricant	plot n°11, survey 239, Kothariya, Rajkot-36022, Gujjarat
3		
CFX1	briskonlaboratories@yahoo.co.in	plot n°11, survey 239, Kothariya, Rajkot-36022, Gujjarat
4		
CFX1	info@associatedbiotech.com	village kishanpura, guru majra road, nalagarh road, baddi, distt, solan, Himachal Pradesh
5		
CFX1	Pas disponible	-
6		
CFX1	sfil87@syncomformulations.com	
7		
CFX1	ujwal@originformulations.com	B-6,7,8,9, sigaddi growth sidcul, kotdwar
8		
CFX1	info@zestpharma.in	275, sector F, Sanwer road
9		
CFX2	info@associatedbiotech.com	village kishanpura, guru majra road, nalagarh road, baddi, distt, solan, Himachal Pradesh
0		
CFX2	briskonlaboratories@yahoo.co.in	plot n°11, survey 239, Kothariya, Rajkot-36022, Gujjarat
1		
CFX2	info@associatedbiotech.com	village kishanpura, guru majra road, nalagarh road, baddi, distt, solan,
2		
CFX2	sfil87@syncomformulations.com	
3		

ECH	Email du fabricant	Adresse du fabricant
CFX2 4	info@astralifecare.com	plot n°57/p sarthay-barva Highway post radoda-382220 taluka
CFX2 5	info@astralifecare.com	plot n°57/p sarthay-barva Highway post radoda-382220 taluka
CFX2 6	info@astralifecare.com	plot n°57/p sarthay-barva Highway post radoda-382220 taluka
CFX2 7	info@zestpharma.in	275, sector F, Sanwer road
CFX2 8	à contacter par mail à partir du site du fabricant	29, av charles de gaule 69230 Saint Genis Laval-France
CFX2 9	corporate@emcure.co.in	Hinjwardi, pune 411057
CFX3 0	briskonlaboratories@yahoo.co.in	plot n°11, survey 239, Kothariya, Rajkot-36022, Guijarat
CFX3 1	briskonlaboratories@yahoo.co.in	plot n°11, survey 239, Kothariya, Rajkot-36022, Guijarat
CFX3 2	déc-16	village kishanpura, guru majra road, nalagarh road, baddi, distt, solan,
CFX3 3	Pas disponible	-
CFX3 4	info@zestpharma.in	275, sector F, Sanwer road
CFX3 5	à contacter par mail à partir du site du fabricant	plot n°11, survey 239, Kothariya, Rajkot-36022, Guijarat
CFX3 6	info@associatedbiotech.com	Baddi, Distt. Solan -174101, H.P

ANNEXE VI : EXEMPLE DE CERTIFICAT DE QUALIFICATION D'UN MATERIEL UTILISE

	<p>D 97877 Wertheim - Germany Bahnhofstrasse 10 Tel.: Int. 0049-9342-912355 Fax: Int. 0049-9342-912357</p> <p>Internet : http://www.isolab.de e-mail : sales@isolabgmbh.de</p>	<p><i>From the center of the German Laboratory- and Glass Industry - Wertheim -</i></p>
---	---	---

15.10.2018

CERTIFICATE OF QUALITY ASSURANCE

Description:	Calibrated Density Bottle 10 ml	
Cat. No.:	S.023.02.010	
Serial No.:	83	
Visual appearance:	Within acceptability limits (According to DIN 12797 and ISO 3507).	
Calibration:	According to ISO 4787, "Laboratory glassware – Volumetric glassware – Methods for use and testing of capacity". The method procedure is based upon a determination of volume of water contained by the vessel. This volume of water is based upon knowledge of its mass and its tabulated density at the reference temperature. This density bottle is calibrated according to DIN/ISO Class "A" tolerances.	
Calculation:	Mass determined by gravimetric calibration: % 100	10,436 g
	Volume calculated acc. to ISO 4787: % 100	10,466 ml

The above mentioned density bottle is calibrated according to the mentioned standards and engraved the specific volume of use.

For and on behalf of



**ANNEXE VII : EXEMPLE DE BON DE LIVRAISON DE STANDARDS PAR LES
FOURNISSEUR AGRES**



DELIVERY NOTE



0041907483C

SHIP TO
Customer nr. F010144003

ULG - CHIMIE ANALYTIQUE
CHU - TOUR PHARMA +2 B36
AVENUE HIPPOCRATE 15
PROF HUBERT PHILIPPE
4000 LIEGE
BELGIUM

BILL TO
Customer nr. F010144001

ULG UNIV DE LIEGE
ADMINISTRATION DES RESSOURCES FIN
SERVICE CONTROLE FACTURES
PLACE DU XX AOUT 7
4000 LIEGE
BELGIUM

Item	Batch	Quantity	Unit	Order ref.	Storage Condition
PO ref: ULG18/1830248/R			Attn:		
A2076-1G	AX4TF-KB		PC	11903651	
Azithromycin Dihydrate					
PO ref: ULG18/1830248/R			Attn:		
T2525-25G	KQ8AE-EI		PC	11903651	Freezer
Tetracycline Hydrochloride					
PO ref: ULG18/1830248/R			Attn:		
C2255-25G	2Y2XD-BP		PC	11903651	
Chloramphenicol					
PO ref: ULG18/1830248/R			Attn:		
E0751-5G	JRD8F-AT		PC	11903651	
Erythromycin					
PO ref: ULG18/1830248/R			Attn:		
N0078-500G	Q8VYO-GP	1	PC	11903651	
Nicotinamide					
PO ref: ULG18/1830248/R			Attn:		
G0272-1G	7AI8D-KQ	1	PC	11903651	Refrigerator
Genistein					

Terms of delivery DDP BELGIUM

Shipped by FEDERAL EXPRESS EUROPE INC.
Shipped on 29/08/2018

Address of local office
TCI Europe nv
Boerenveldseweg 6 - Haven 1063
2070 Zwijndrecht
BELGIUM

Phone nr +32(0)3 7350700
Fax nr +32(0)3 7350701
e-mail address sales-eu@tcichemicals.com

**Bon de livraison****174475****N° client:** 1256**Date:** 29/08/18 **TVA client:**

Handelsstrasse, 16

BE 4700 EUPEN

Tél. 087/595170

Fax 087/595179

RCE/HRE: 39893

TVA/BTW: BE411886447

Adresse de livraison:

ULG PROF. HUBERT

INST. DE PHARMACIE CHIMIE ANALYT.

Ave Hippocrate, 15 (Quartier Hopital) B36+2

BE - 4000 SART TILMAN/LIEGE 1

Tournée: Liège

Page 1

Pos.	Référence	Description	Unité	Cmdé	A livrer	BO	Empl.						
1	BA 8402.2500	<p>Notre réf.: 143130 - Votre référence: ULG18/1830245/R</p> <p>BAKER METHANOL HPLC GRADIENT GRADE</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Batch Nr.</th> <th>expiration date</th> <th>quantity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1820001876</td> <td>31/07/20</td> <td>8.00</td> </tr> </tbody> </table> <p>ADR: 3.II</p> <p>UN: 1230 Méthanol</p>	Batch Nr.	expiration date	quantity	1820001876	31/07/20	8.00	2,5 L	8,00	8,00	0,00	M03901
Batch Nr.	expiration date	quantity											
1820001876	31/07/20	8.00											
Conditions de livraison Nos soins			Nbre de colis 2 OLI										
Point: 47,52													
Tel: 0043664316													

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

1. PUBLICATIONS

2. **Mwamba TP**, Bakari SA, Rongorong KE, Bokanya IA, Mukeba MB, Duez P, Kalonji JB (2015). Enquête sur la contrefaçon de quelques anti-infectieux administrés par os commercialisés dans la ville de Lubumbashi. *Pan African Medical Journal*. 22 : 318-22.
3. **Mwamba TP**, Rongorong KE, Bashige CV, Mbayo KG, Ntabaza NV, Sumbu NT, Numbi WI, Duez P, Kalonji JB (2016). Preliminary study on counterfeiting of artemether and artesunate marketed in Lubumbashi. *Pharmacology & Pharmacy*. 7: 185-92.
4. **Mwamba TP**, Duez P, Kalonji JB (2016). Preliminary survey of counterfeiting of albendazole and metronidazole marketed in Lubumbashi. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 8 (7): 282-7.
5. Tshilombo NK, Hamuli CP, Mbinze JK, Habyalimana V, Kalenda DT, Mavungu DJ, **Mwamba TP**, Hubert P, Marini RD (2018). Investigation of the Quality of Antibiotics-Based Amoxicillin for Monitoring of Some Different Medicine Markets of Democratic Republic of Congo. *American Journal of Analytical Chemistry*. 9: 366-385.
6. **Mwamba TP**, Moke Muindu, Mutshitshi Kasongo, Gaelle Kalonji Mujinga, Mbedi Zabakani, Joel Kabadi Kasongo, , Musumba Tshamba, Nkwanga Jean Claude, Roland Marini Djang'eing, Pierre Duez, Kalonji Ndoumba Jean-Baptiste (2019). Substandard/falsification antibacterial agent : a systematic review on spectrophotometric and chromatographic methods for their detection. *American Journal of Analytical Chemistry* 10: 348-65.

2. COMMUNICATION ORALE

1. **Mwamba TP**, Duez P, Kalonji JB (2014). Enquête sur la contrefaçon de quelques anti-infectieux administrés par os commercialisés dans la ville de Lubumbashi. Journées Scientifiques Facultés de Médecine, Sciences Pharmaceutiques et Ecole de Santé Publique. Lubumbashi, RD Congo.
2. **Mwamba TP**, Duez P, Kalonji JB (2016). Etude préliminaire de la contrefaçon des anti-infectieux consommés dans la ville de Lubumbashi. Journées Scientifiques en Santé Publique. Lubumbashi, RD Congo
3. **Mwamba TP**, Bokanya, A.I., Kalonji, M.G., Duez, P., Kalonji, .J.B. (2018). Profil de l'utilisation des antibiotiques et des pathologies infectieuses à Lubumbashi, étude rétrospective portant sur 2014-2015. *Conference à Karavia*. Lubumbashi.
4. **Mwamba TP**, Palimieri C, Marini R, Duez P, Kalonji NJB (2019). Development and application of total error strategy in the validation of LC methods to detect substandard antibiotics. Journées Internationale de Recherche en Sciences de la Santé. Lubumbashi, RD Congo

3. POSTERS

1. **Mwamba TP**, Palimieri C, Marini R, Duez P, Kalonji NJB (2019). Development and application of total error strategy in the validation of spectrophotometric methods to detect substandard antibiotics. Journées Internationale de Recherche en Sciences de la Santé. Lubumbashi, RD Congo
2. **Mwamba TP**, Bokanya IA, Kalonji MG, Duez P, Kalonji NJB (2018). Contrefaçon et malfaçon des Antibiotiques: Une revue systématique des méthodes Chromatographiques et spectrophotométriques pour leur détection. Forum International à Ouagadougou. BurkinaFaso 2018.