

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université - Saad Dahleb - Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et la Vie  
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire



Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du Diplôme de  
Master en Sciences Biologiques  
Option : MICROBIOLOGIE  
Domiciliée au Laboratoire Biotechnologies, Environnement et Santé

THEME

**Vérification de la Qualité Microbiologique de deux  
Médicaments Génériques (Comprimé Nebcar® et  
Suspension Abilizole®) par une Méthode Adéquate  
de la Pharmacopée Américaine.**

Présenté par

**SAOUD Hanane  
HASSAM Asmaa**

Date de Soutenance  
Mardi 03/07/2018

Devant le jury composé de :

M. GUEDIOURA A.	Maître de Conférences	Univ. Blida 1	Président
Mme BOUDJEMAA N.	Maître de Conférences	Univ. Blida 1	Examinatrice
M. BOUKHATEM M.N.	Maître de Conférences	Univ. Blida 1	Promoteur
M. AMRI R.	Chef de Service	Laboratoires El-Kendi, Alger	co-Promoteur

☞ Promotion: 2017-2018 ☞

## REMERCIEMENTS

---

Tout d'abord, louange à « Allah » qui nous a guidé sur le droit chemin tout au long du travail et nous a inspiré les bons pas et les justes reflexes. Sans sa miséricorde, ce travail n'aurait pas abouti.

Nos sincères considérations et remerciements sont également exprimés aux membres du jury :

- Dr. GUEDIOURA A, pour nous avoir fait l'honneur et le plaisir de présider ce jury.
- Dr. BOUDJEMAA N, d'avoir accepté de faire partie du jury et de donner de son temps pour examiner ce travail.

Nous tenons à remercier notre promoteur Mr. BOUKHATEM MN., pour son encadrement fructueux, sa générosité et son suivi au cours de notre stage.

Nous tenons à remercier notre co-promoteur Mr. AMRI R., pour sa disponibilité, son assistance et sa patience pour répondre à nos nombreuses questions.

Au terme de la rédaction de ce mémoire, c'est un devoir agréable d'exprimer en quelques lignes la reconnaissance que nous devons à Dr SAOUD S qui a suivi ce travail dans tous ses détails avec une rigueur scientifique exceptionnelle, et qui l'a enrichi avec ses conseils et ses échanges amicaux.

Par la même volonté et la même chaleur, nous remercions toute l'équipe du laboratoire de contrôle qualité, Mme ABDANOUR, Mr SENDJAKEDINE, Mr ROUANE, Mr BOUAMAMA, Mr EL HADJ, Mr GHIAT, Mr DJNENDAR et Mme HANOUNI, toute notre reconnaissance à eux pour l'expérience enrichissante et pleins d'intérêts qu'ils nous ont fait vivre durant la période du stage.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements à Monsieur BASTA K., le manager du département QC à « EL KENDI Pharmaceutical Manufacturing Company » ; nous lui exprimons notre immense gratitude, pour nous avoir accueilli au sein du département et d'avoir mis à notre disposition tout le matériel nécessaire pour réaliser ce travail.

Nos remerciements vont également à Dr BEKKARI K et Dr BEKKARI N ainsi que Mr BELALIA M qui nous ont aidés à la réalisation de notre travail.

Un profond respect à tous nos professeurs qui nous ont enseigné durant notre cursus, à nos collègues et à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*A mes chers parents*

*qui ont cru en moi, qui m'ont toujours encouragé, soutenu et ont tout fait pour mon bien être, aucune expression ne peut leur traduire mon amour, mon profond respect et ma sincère gratitude.*

*A ma très chère sœur Samah et mon très cher frère Abdelghani.*

*A mes chers oncles et leurs femmes, tantes et leurs époux, cousins et cousines.*

*Je remercie infiniment mes chers oncles : Mohamed, Rachid, Mourad, Karim et Faouzi pour leur aide et soutien durant mes années d'étude, je leur suis très reconnaissante.*

*A l'esprit de mon très cher grand père Rabah, a l'esprit de mes grands parents Mohamed, Zohra et Yamina que Dieu le miséricordieux les accueille en son vaste paradis.*

*A ma chère grand-mère Ouardia que Dieu, le tout puissant, lui préserve et lui accorde santé, longue vie et bonheur.*

*A tout les membres des familles SAOUD et O'UTERBAH grands et petits.*

*A mes enseignants de l'école primaire jusqu'à l'université; qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.*

*A mes chères amies : Asma, Amina, Nawal, Houda*

*A tous ceux dont je n'ai pas cité le nom mais pour qui j'ai une pensée en ce moment*

*Hanane*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce mémoire à :*

*Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*A ma petite sœur ZAHIRA, mes chers frères MOHAMED, MOUNIR et ma belle-sœur ZAKIA, En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous.*

*Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, santé et de réussite*

*A Mon cher grand-père paternel Ma chère grand-mère maternelle. Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.*

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,*

*A mes chères copines : Amina, Nawel, Djihad, Amira et mon adorable copine cousine Sarah*

*Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter.*

*En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

*A mon adorable binôme pour toujours Hanane, pour la sœur agréable qu'elle était et qu'elle le restera à jamais pour moi.*

*Sans oublié toutes les personnes que je porte dans mon cœur. Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible.*

*Que tous ceux qui ne sont pas cités nommément ne se sentent pas lésés, Je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

*Asmaa...*

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1:</b> Critères d'acceptation de la qualité microbiologique des formes pharmaceutiques	16
<b>Tableau 2 :</b> Références des souches utilisées dans la validation	19
<b>Tableau 3 :</b> Milieux de culture utilisés	20
<b>Tableau 4 :</b> Les valeurs standardisées des souches de référence	23
<b>Tableau 5 :</b> Résultats du test de stérilité des milieux de culture solides et liquides.	34
<b>Tableau 6 :</b> Résultats du test de fertilité des milieux de culture gélosés ordinaires	36
<b>Tableau 7 :</b> Récapitulation des résultats du test de fertilité du bouillon	37
<b>Tableau 8 :</b> Résultats du test de fertilité du milieu gélosé	37
<b>Tableau 9 :</b> Résultats de contrôle microbiologique de l'eau purifiée	38
<b>Tableau 10 :</b> Résultats de contrôle microbiologique de l'eau brute	38
<b>Tableau 11 :</b> Résultats du contrôle microbiologique de l'air actif	40
<b>Tableau 12 :</b> Résultats du contrôle microbiologique des surfaces	40
<b>Tableau 13 :</b> Résultats du dénombrement des germes aérobies viables totaux	42
<b>Tableau 14 :</b> Récapitulation des résultats de la détermination de l'inoculum	46
<b>Tableau 15 :</b> Résultats de la détermination de l'inoculum	47
<b>Tableau 16:</b> Récapitulation des résultats obtenus pour le dénombrement des germes aérobies viables totaux pour le produit Nebcar®	50
<b>Tableau 17 :</b> Récapitulation des résultats obtenus pour le dénombrement des levures et moisissures pour le produit Nebcar®	51
<b>Tableau 18 :</b> Récapitulation des résultats obtenus pour le dénombrement des germes aérobies viables totaux pour le produit Abilizole®	52
<b>Tableau 19 :</b> Récapitulation des résultats obtenus pour le dénombrement des levures et moisissures pour le produit Abilizole®	52
<b>Tableau 20:</b> Résultats de la validation de la recherche des germes spécifiques pour Nebcar®	55
<b>Tableau 21 :</b> Résultats de la validation de la recherche des germes spécifiques pour Abilizole®	55

## Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : Effets cardiovasculaires du Néбиволол	9
<b>Figure 2</b> : Mécanismes d'action du l' Aripiprazole	9
<b>Figure 3</b> : Les produits analysés Nebcar <sup>®</sup> et Abilizole <sup>®</sup>	20
<b>Figure 4</b> : Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale	21
<b>Figure 5</b> : Etapes de contrôle microbiologique (dénombrement des germes aérobies viables totaux) pour les deux produits Nebcar <sup>®</sup> et Abilizole <sup>®</sup>	27
<b>Figure 6</b> : Schéma des étapes de la recherche d' <i>E. coli</i> pour les produits Nebcar <sup>®</sup> et Abilizole <sup>®</sup> par la méthode de dénombrement sur plaque de gélose	29
<b>Figure 7</b> : Protocole de la validation de la méthode de dénombrement des germes aérobies viables totaux pour les produits Abilizole <sup>®</sup> et Nebcar <sup>®</sup>	31
<b>Figure 8</b> : Schéma de la validation de la recherche d' <i>E.coli</i> pour les produits Nebcar <sup>®</sup> et Abilizole <sup>®</sup> par la méthode de dénombrement sur plaque de gélose...	33
<b>Figure 9</b> : Résultats du test de stérilité.	35
<b>Figure 10</b> : Résultats du contrôle microbiologique de l'eau purifiée	39
<b>Figure 11</b> : Résultats du contrôle microbiologique de l'eau potable.	39
<b>Figure 12</b> : Résultats du contrôle microbiologique de l'air actif dans les milieux SDA et TSA	41
<b>Figure 13</b> : Résultats du contrôle microbiologique des surfaces	41
<b>Figure 14</b> : Dénombrement des germes aérobies viables en absence et en présence du produit.	44
<b>Figure 15</b> : Résultats du dénombrement des germes spécifiques	44
<b>Figure 16</b> : Détermination de la charge microbienne (Nebcar <sup>®</sup> )	48
<b>Figure 17</b> : Détermination de la charge microbienne (Abilizole <sup>®</sup> )	48
<b>Figure 18</b> : Validation de la méthode de dénombrement des germes aérobies viables (Nebcar <sup>®</sup> ).	53
<b>Figure 19</b> : Résultats de la validation de la méthode de dénombrement des germes aérobies viables (Abilizole <sup>®</sup> ).	53
<b>Figure 20</b> : Diagramme en barres des résultats de dénombrement des souches en absence et en présence du produit Nebcar <sup>®</sup>	54
<b>Figure 21</b> : Diagramme en barres des moyennes des résultats de dénombrement des souches en absence et en présence du produit Abilizole <sup>®</sup>	54
<b>Figure 22</b> : Validation de la méthode de recherche des germes spécifiques pour le Nebcar <sup>®</sup> .	56
<b>Figure 23</b> : Résultats de la validation de la méthode de recherche des germes spécifiques ( <i>E.coli</i> ) pour l' Abilizole <sup>®</sup> .	56

## Liste des Abréviations

---

BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication
CIP	Centre Institut Pasteur de France
DCI	Dénomination Commune Internationale
DGAT	Dénombrement des Germes Aérobie Total
DMLT	Dénombrement des Moisissures/Levures Totales
EDTA	Éthylène Diamine Tétra Acétique
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance
HTA	Hypertension Artérielle
IC	Insuffisance Cardiaque
ISO	Organisation Internationale de Normalisation
LD	Limite de Détection
LPS	Lipopolysaccharides
MCA	Mac Conkey Agar
MCB	Mac Conkey Broth
MMR	Méthodes Microbiologiques rapides
mmHg	Millimètre de mercure
MO	Micro-organismes
NOS	Oxyde Nitrique Synthase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Principe Actif
Ph. Eur	Pharmacopée Européenne
R2A	Reasoners 2 Agar
RODAC	Détection et Comptage d'Organismes Répliqués
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
TSA	Trypticase Soja Agar
TSB	Trypticase Soja Broth
UFC	Unité Formant Colonie
USP	United States Pharmacopeia
ZAK	Zones d'Atmosphère Contrôlée
®	Marque enregistrée ou déposée

**Résumé :**

Le contrôle de qualité microbiologique est une partie essentielle du processus de fabrication pharmaceutique afin de garantir la qualité et la sécurité des produits. L'objectif principal de cette étude est de valider l'utilisation d'une méthode de contrôle microbiologique pour déterminer la qualité des deux produits finis non obligatoirement stériles Nebcar<sup>®</sup> et Abilizole<sup>®</sup>. Les résultats obtenus ont montré la conformité de la qualité de l'eau, de l'environnement ainsi que les produits finis avec les normes préconisées par les pharmacopées. De plus, après validation la méthode utilisée dans le contrôle microbiologique des deux produits finis Nebcar<sup>®</sup> et Abilizole<sup>®</sup> s'est révélée adéquate pour le dénombrement des germes aérobies viables totaux, des levures et moisissures et la recherche des germes spécifiques. Au cours de la validation, la dilution adéquate pour le contrôle microbiologique a été déterminée, les résultats montrent que les dilutions 1/10 et 1/50 de Nebcar<sup>®</sup> étaient adéquates et présentaient des résultats conformes aux normes recommandées par les pharmacopées et cela varie selon la souche à contrôler entre 1/50 et 1/10. Tandis que la dilution adéquate pour Abilizole<sup>®</sup> est 1/10 pour toutes les souches testées. Ces dilutions des produits seront utilisées pour le contrôle de la qualité microbiologiques des deux produits finis Nebcar<sup>®</sup> et Abilizole<sup>®</sup> après chaque production.

**Mots clés :** Contrôle de qualité microbiologique, Validation de la méthode, Produits finis non obligatoirement stériles, Nebcar<sup>®</sup>, Abilizole<sup>®</sup>.

**Abstract:**

Microbiological quality control is an essential part of the pharmaceutical manufacturing process to ensure the quality and safety of products. The main objective of this study is to validate the use of a microbiological control method to determine the quality of the two non-necessarily sterile finished products Nebcar<sup>®</sup> and Abilizole<sup>®</sup>. The obtained results showed the conformity of the quality of the water, the environment as well as the finished products with the standards recommended by the pharmacopoeias. In addition, after validation, the method used in the microbiological control of the two finished products Nebcar<sup>®</sup> and Abilizole<sup>®</sup> proved to be adequate for the enumeration of the total viable aerobic germs, yeasts and molds and the search for specific germs. During the validation, the appropriate dilution for the microbiological control was determined, the results show that the 1/10 and 1/50 dilutions of Nebcar<sup>®</sup> were adequate and showed results in accordance with the standards recommended by the pharmacopoeias and this varies according to the controlled strain between 1/50 and 1/10. While the adequate dilution for Abilizole<sup>®</sup> is 1/10 for all strains tested. These product dilutions will be used to control the microbiological quality of both finished products Nebcar<sup>®</sup> and Abilizole<sup>®</sup> after each production.

**Keywords:** Microbiological quality control, Validation of the method, Non-necessarily sterile finished products, Nebcar<sup>®</sup>, Abilizole<sup>®</sup>.

## ملخص :

تعتبر مراقبة الجودة الميكروبيولوجية جزءاً أساسياً من عملية تصنيع المستحضرات الصيدلانية لضمان جودة وسلامة المنتجات. الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو التحقق من صحة استخدام طريقة لتحديد النوعية الميكروبيولوجية لمستحضرين صيدليين نهائيين ليسا بالضرورة معقمين <sup>®</sup> Abilizole <sup>®</sup> Nebcar. أظهرت النتائج امتثال نوعية المياه والبيئة والمنتجات النهائية مع المعايير الموصى بها من قبل دساتير الأدوية. بالإضافة إلى ذلك، بعد التحقق من صحة الطريقة المستخدمة في الاختبارات الميكروبيولوجية لكل من المنتجين النهائيين <sup>®</sup> Abilizole <sup>®</sup> Nebcar ثبت أنها مناسبة لتعداد مجموع الهوائية البكتيريا الهوائية الحية والخميرة والعفن والبحث عن الجراثيم المحددة. أثناء التحقق من صحة الطريقة المستخدمة، تم تحديد التخفيف المناسب لمراقبة الجودة الميكروبيولوجية، فقد بينت النتائج أن التخفيفات 10/1 و 50/1 ل <sup>®</sup> Nebcar مناسبة وأظهرت نتائج تتماشى مع المعايير الموصى بها من قبل دساتير الأدوية وهذا يختلف حسب السلالة المختبرة بين 10/1 و 50/1. في حين أن التخفيف المناسب لـ <sup>®</sup> Abilizole هو 10/1 لجميع السلالات التي تم اختبارها. هذه التخفيفات سوف تستخدم لمراقبة الجودة الميكروبيولوجية للمنتجين النهائيين و <sup>®</sup> Abilizole <sup>®</sup> Nebcar بعد كل الإنتاج.

**الكلمات المفتاحية :** مراقبة الجودة الميكروبيولوجية ، التحقق من الطريقة ، مستحضرين صيدليين نهائيين ليسا بالضرورة معقمين ، <sup>®</sup> Abilizole ، <sup>®</sup> Nebcar.

## Glossaire

**Antagoniste** : une molécule qui interagit avec un ou plusieurs récepteurs d'une molécule naturelle de l'organisme (le ligand endogène) en bloquant la capacité de ce(s) récepteur(s) d'interagir avec cette molécule naturelle et en diminuant ainsi l'effet physiologique de cette dernière.

**Antipsychotiques** : Les neuroleptiques, également appelés antipsychotiques, sont des médicaments administrés dans le but de réduire ou atténuer certaines psychoses. Ils peuvent avoir diverses actions (anti délirante, anti hallucinatoire, anti confusionnelle, désinhibitrice ou sédative). Ces médicaments sont divisés en deux grandes catégories : les antipsychotiques conventionnels, et les antipsychotiques dits de 2<sup>e</sup> génération.

**Bêtabloquants sélectifs** : un bêta-bloquant est un médicament utilisé en cardiologie qui bloque l'action des médiateurs du système adrénergique tels que l'adrénaline.

**Brevet** : un droit exclusif accordé sur une invention. En d'autres termes, c'est un droit exclusif sur un produit ou un procédé qui constitue en général une nouvelle façon de faire quelque chose ou apporte une nouvelle solution technique à un problème.

**Effet pyrogène** : pyrogène signifie qui « élève la température », « donne de la fièvre ».

**Faux positif** : est le résultat d'une prise de décision dans un choix à deux possibilités (positif et négatif), déclaré positif, là où il est en réalité négatif. Le résultat peut être issu d'un test d'hypothèse, d'un algorithme de classification automatique, ou tout simplement d'un choix arbitraire.

**Héparine** : l'héparine appartient au groupe de médicaments appelés anticoagulants qui freinent le processus de coagulation du sang et cette action prévient la formation de dangereux caillots dans les vaisseaux sanguins.

**Licence** : est un acte par lequel le propriétaire d'une marque donne à un tiers la possibilité de vendre un de ses produits sous une forme différente de ses produits d'origine.

**Lipopolysaccharides** : est un composant majeur de la surface externe des bactéries Gram négatives. Le LPS est composé de trois entités synthétisées séparément : le lipide A, le noyau et l'antigène O, qui seront, par après, assemblées l'une à l'autre.

**Lyophilisation :** Procédé de conservation d'une substance, d'un corps, et notamment de produits alimentaires et pharmaceutiques, consistant en une congélation rapide et une déshydratation presque totale du produit concerné, qui est ensuite conservé sous vide à la température ambiante et retrouve ses qualités et propriétés premières par simple addition d'eau.

**Médicament générique :** est conçu à partir de la molécule d'un médicament déjà autorisé (appelé médicament d'origine ou princeps) dont le brevet est désormais tombé dans le domaine public. Il doit avoir la même composition qualitative et quantitative en principes actifs, la même forme pharmaceutique que le princeps et démontrer qu'il a la même efficacité thérapeutique (même biodisponibilité).

**Monographie :** une monographie est composée d'un ensemble de spécifications qui définissent les caractéristiques qualitatives et quantitatives d'une substance en vue d'assurer une qualité optimale compatible avec les exigences de santé publique. Elle comprend une liste de dénominations communes et scientifiques de substances.

**Patients athéromateux :** sujets atteints de l'athéromatose qui est une maladie artérielle diffuse et progressive caractérisée par l'altération de la paroi artérielle par des dépôts graisseux, qui d'une part épaississent les parois et peuvent obstruer les artères, et d'autre part les affaiblissent et peuvent provoquer leur dilatation.

**Peptone :** Les peptones sont des mélanges d'acides aminés et de polypeptides. Elles proviennent de l'action d'une enzyme protéolytique sur une substance contenant de nombreuses protéines comme les viandes ou les poissons mais aussi le sang ou la fibrine (protéine dérivée du fibrinogène et qui intervient dans le phénomène de coagulation)..

**Pharmacopée Européenne :** est un recueil de normes communes, à l'échelle européenne, destinées au contrôle de la qualité des médicaments à usage humain ou vétérinaire et des substances qui entrent dans leur composition. Son objectif est d'assurer à tous les patients, sur l'ensemble du continent européen, l'accès à des médicaments de même niveau de qualité. Les textes de la pharmacopée européenne (les « monographies ») définissent des exigences de qualité, générales ou spécifiques, auxquelles doivent satisfaire les substances pharmaceutiques qui composent les médicaments, ainsi que les formes pharmaceutiques finales. La pharmacopée européenne décrit également des méthodes d'analyse de référence.

**Pression artérielle diastolique** : correspond à la tension artérielle mesurée lors de la phase de relâchement du cœur.

**Pression artérielle systolique** : est la valeur de la pression dans l'artère au moment où le cœur se contracte.

**Princeps** : est un médicament qui incorpore pour la première fois un principe actif qui a été isolé ou synthétisé par un laboratoire pharmaceutique. Il s'agit en quelques sortes du médicament « original », il est protégé par un brevet d'une durée variable (de l'ordre de 10 ans) qui assure au laboratoire qui l'a déposé l'exclusivité de son exploitation et de sa commercialisation (il est le seul à pouvoir vendre un médicament avec ce principe actif).

**Sapidité** : fait d'être savoureux, c'est-à-dire d'avoir du goût et de laisser une impression très favorable.

**Spécifications** : document décrivant en détail les caractéristiques auxquelles doivent répondre les matières premières, articles ou produits utilisés ou obtenus au cours de la fabrication.

**Tween** : ce sont des molécules amphiphiles utilisées comme tensioactifs (émulsifiants), connu également sous le nom de polysorbate, utilisé comme excipient pour stabiliser les formulations aqueuses et c'est un agent neutralisant de l'activité antimicrobienne.

## Table des matières

Introduction .....	1
--------------------	---

### Chapitre I : Généralités

I.1. Généralités sur les médicaments .....	3
I.1.1. Définition des médicaments.....	3
I.1.2. Mise en forme d'un médicament .....	3
I.1.2.1.Principe actif .....	3
I.1.2.1.Excipient .....	3
I.1.2.3.Récepteur .....	3
I.1.3.Développement d'un médicament .....	4
I.1.3.1.Matières premières.....	4
I.1.3.2. Produit fini .....	4
I.1.4.Formes galéniques d'un médicament.....	4
I.1.4.1.Formes orales .....	5
I.1.4.1.1.Capsules ou gélules.....	5
I.1.4.1.2.Comprimés .....	5
I.1.4.1.3.Solutions (sirop – gouttes) .....	5
I.1.4.2.Forme nasale .....	5
I.1.4.3. Forme injectable.....	5
I.1.4.4.Forme dermique .....	5
I.1.4.5.Forme inhalée.....	6
I.1.4.6.Forme rectale .....	6
I.2. Présentation des médicaments étudiés .....	6
I.2.1.Présentation de Nebcar® .....	6
I.2.1.1.Propriétés pharmacologiques .....	6
I.2.1.2.Hypertension artérielle.....	7
I.2.1.3.Insuffisance cardiaque chronique .....	7
I.2.2.Présentation d'Abilizole® .....	8
I.2.2.1.Propriétés pharmacologiques .....	8
I.2.2.2.Schizophrénie.....	10
I.2.2.3.Episodes maniaques (troubles bipolaires).....	10

I.3. Contrôle de qualité .....	10
I.3.1.Définition de Contrôle .....	10
I.3.2.Définition de la qualité.....	11
I.3.3.Objectif du contrôle de qualité.....	11
I.3.4.Les cinq M .....	11
I.3.5.Différents types de contrôle de qualité .....	12
I.3.5.1.Contrôle physico-chimique .....	12
I.3.5.2.Contrôle microbiologique .....	12
I.3.6.Contamination microbiologique ou bio-contamination .....	12
I.3.7.Modalités de contrôle en industrie pharmaceutique .....	13
I.3.7.1.Contrôle des matières premières .....	13
I.3.7.2.Contrôle de l'eau .....	13
I.3.7.3.Suivi environnemental .....	13
I.3.7.4.Contrôle microbiologique de l'air.....	14
I.3.7.5.Contrôle du personnel .....	14
I.3.7.6.Contrôle du produit .....	14
I.3.7.6.1.Produits stériles .....	14
I.3.7.6.2. Produits non obligatoirement stériles.....	15
I.4. Validation des méthodes d'analyse en industrie pharmaceutique .....	15
I.4.1.Définition de la validation .....	15
I.4.2.Caractéristiques des méthodes analytiques .....	17
I.4.3.Intérêts de la validation des méthodes de contrôle microbiologique .....	17

## **Chapitre II : Matériels et Méthodes**

II.1. Matériel d'études .....	19
II.1.1. Matériel biologique.....	19
II.1.2. Matériel non biologique.....	19
II.2. Méthodes .....	20
II.2.1. Préparation des milieux de culture .....	22
II.2.1.1.Les étapes de préparation .....	22
II.2.2.Contrôle de la qualité des milieux de culture .....	22
II.2.2.1.Test de stérilité.....	22

II.2.2.2. Test de fertilité.....	22
II.2.2.2.1. Préparation de la solution mère des souches .....	22
II.2.2.2.2. Fertilité des milieux de culture généraux et sélectifs .....	23
II.2.3. Contrôle microbiologique de l'eau .....	23
II.2.3.1. Procédé de contrôle microbiologique de l'eau .....	24
II.2.4. Contrôle microbiologique de l'environnement.....	24
II.2.5. Contrôle microbiologique des produits pharmaceutiques non obligatoirement stériles... 26	
II.2.5.1. Dénombrement des germes aérobies viables totaux .....	26
II.2.5.2. Protocole d'analyse microbiologique .....	26
II.2.5.3. Recherche des germes spécifiques .....	28
II.2.6. Validation de la méthode de dénombrement sur plaque de gélose et recherche des germes spécifiques dans Nebcar <sup>®</sup> et Abilizole <sup>®</sup> .....	28
II.2.6.1. Protocole de la validation .....	28
II.2.6.2. Préparation des dilutions des souches de référence pour l'obtention du volume à inoculer.....	28
II.2.6.3. Détermination du volume à inoculer .....	29
II.2.6.4. Dénombrement des germes aérobies viables totaux en présence et en absence des produits finis Nebcar <sup>®</sup> et Abilizole <sup>®</sup> .....	29
II.2.6.5. Validation de la recherche des germes spécifiques .....	32

### **Chapitre III : Résultats et Discussion**

III.1. Résultats du test de stérilité des milieux de culture .....	34
III.2. Résultats du test de fertilité .....	34
III.2.1. Résultats du test de fertilité des milieux de culture gélosés ordinaires .....	36
III.2.2. Résultats du test de fertilité d'un milieu de culture général liquide.....	36
III.2.3. Résultats du test de fertilité des milieux sélectifs, solide (MCA) et liquide (MCB).....	37
III.3. Résultats du contrôle microbiologique de l'eau .....	38
III.4. Résultats du contrôle microbiologique de l'environnement.....	40
III.4.1. Résultats du contrôle microbiologique de l'air .....	40
III.4.2. Résultats du contrôle microbiologique des surfaces .....	40
III.5. Résultats de l'analyse microbiologique des produits pharmaceutiques non obligatoirement stériles (Nebcar <sup>®</sup> et Abilizole <sup>®</sup> ) .....	42
III.5.1. Résultats du dénombrement des germes aérobies viables totaux en absence et en présence du produit .....	42

III.5.2. Résultats de la recherche des germes spécifiques d'E.coli .....	43
III.6. Résultats de la validation de la méthode de dénombrement des GAVT et GLMT pour les produits non obligatoirement stériles .....	45
III.6.1. Résultats de la détermination du volume à inoculer pour le produit Nebcar <sup>®</sup> 5mg .....	45
III.6.2. Résultats de la détermination de l'inoculum pour l'Abilizole <sup>®</sup> 1mg/ml .....	47
III.6.3. Résultats de la validation de la méthode de dénombrement des germes aérobies viables totaux .....	49
III.6.4. Résultats de la validation de la méthode de recherche des germes spécifiques .....	55
<b>IV. Discussion générale .....</b>	<b>57</b>
<b>V. Conclusion et perspectives .....</b>	<b>59</b>
Références bibliographique .....	61
Annexes	

# INTRODUCTION

## Introduction

Le secteur de la santé publique est un secteur particulièrement compliqué et délicat. Il se présente comme un système composé de plusieurs volets interactifs. Le médicament constitue à ce titre le volet le plus appréciable (**Ankri, 1999**).

La qualité des médicaments est un des majeurs soucis des professionnels des services de santé et des patients ; elle se définit par la maîtrise de l'ensemble des paramètres et propriétés qui permettent d'assurer la sécurité des patients, et amener le médicament à un niveau d'exigences satisfaisant. Afin d'atteindre cette qualité, il faut évaluer tous les risques susceptibles à la détérioration du médicament et qui affectent la santé du patient (**Khan et Akhtar, 2015**).

Les médicaments risquent des altérations à différents niveaux de la chaîne de fabrication. Elles peuvent être d'ordre physico-chimique, ou microbiologique, d'où le producteur doit suivre tout le processus de fabrication et les étapes de contrôle qualité au sein des laboratoires ; ce contrôle de qualité s'exerce à tous les stades, sur les matières premières, sur le produit en cours de la fabrication, et sur le produit fini (**Sengupta et al., 2018**).

En outre, la qualité du médicament est régie de façon réglementaire et minutieusement examinée durant tout le processus de développement, fabrication et de contrôle. En effet, l'industrie pharmaceutique a pour objectif la mise en œuvre de méthodes performantes de fabrication et de contrôle en vue de promouvoir un meilleur accès à un traitement sûr et efficace (**Siddiqui et al., 2017**).

L'industrie pharmaceutique est l'une des industries les plus importantes économiquement elle regroupe les activités de recherche, de fabrication et de commercialisation des médicaments pour la médecine humaine ou vétérinaire (**Cline, 2007**).

En Algérie, l'industrie pharmaceutique a connu une révolution importante durant ces dernières années, les travaux présentés dans ce mémoire, ont été réalisés dans l'une des industries algériennes «EL KENDI Pharmaceutical Manufacturing Compagny» situé à Errahmania (Alger).

La validation est l'action de prouver, conformément aux principes de bonnes pratiques et règlements, que toute procédure, processus, équipement, matériel, activité ou système conduit effectivement et systématiquement aux résultats attendus (**World Health Organization, 2011**).

Dans cette optique, notre travail de fin d'études au sein du laboratoire de microbiologie de l'industrie pharmaceutique « EL KENDI » consiste à :

- La réalisation de la validation d'une méthode d'analyses microbiologiques, à savoir le dénombrement des germes aérobies viables totaux, les levures et les moisissures ainsi que la recherche des germes spécifiques pour les nouveaux produits finis Nebcar<sup>®</sup> (comprimé) et Abilizole<sup>®</sup> (suspension) non obligatoirement stériles.

Les produits n'étant pas encore disponibles sur le marché algérien, l'objectif de notre travail de validation est de s'assurer que la méthode appliquée dans l'analyse microbiologique de ces nouveaux produits procure des résultats suffisamment fiables et garantit une commercialisation des produits de qualité et conformes aux normes des pharmacopées.

# GÉNÉRALITÉS

## I. Généralités

### I.1. Généralités sur les médicaments

#### I.1.1. Définition des médicaments

Un médicament est toute substance possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal, ou pouvant leur être administrée en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique (**Gouraud, 2012; Durant et Jeune, 2017**).

#### I.1.2. Mise en forme d'un médicament

Un médicament se compose d'un ou de plusieurs principes actifs et d'excipients. L'ensemble est contenu dans un récipient (**Talbert et Willoquet, 2017**).

##### I.1.2.1. Principe actif

Le principe actif d'un médicament est une substance d'origine chimique ou naturelle caractérisée par un mécanisme d'action curatif ou préventif précis dans l'organisme. C'est une substance active douée de propriétés pharmacologiques, et est donc à la base de l'effet thérapeutique (**Talbert et Willoquet, 2017**).

##### I.1.2.2. Excipient

L'excipient est une substance d'origine chimique ou naturelle qui facilite l'utilisation du médicament mais ne présente pas d'effet curatif ou préventif. La fonction d'un excipient est de servir de vecteur (véhicule ou base) au principe actif ou d'entrer dans la composition du vecteur contribuant ainsi à certaines propriétés du produit tel que la stabilité, le profil biopharmaceutique, l'aspect et l'acceptabilité pour le patient et la facilité de fabrication (**Le Hir et Janot, 2001**).

##### I.1.2.2. Récipient

Le récipient est destiné au conditionnement protégeant ainsi le médicament de l'environnement extérieur. L'ensemble est regroupé dans un emballage accompagné d'une notice explicative (**Talbert et Willoquet, 2017**).

### I.1.3. Développement d'un médicament

La chimie pharmaceutique revêt une complexité croissante et comporte des opérations en plusieurs étapes; le produit issu d'une étape devient la matière première de l'étape suivante, et cela jusqu'à la synthèse du produit fini (**Tait, 2015**).

#### I.1.3.1. Matières premières

On entend par matière première à usage pharmaceutique tous les composants des médicaments : les principes actifs, les excipients, et les éléments de mise en forme pharmaceutique, destinés à être utilisés chez l'homme ou chez l'animal. Les matières premières pharmaceutiques peuvent être des substances chimiques ou d'origine naturelle, issues de sources biologiques ou minérales (**Husson, 2011**).

#### I.1.3.2. Produit fini

C'est un médicament qui a un nom commercial, qui a fait l'objet d'un enregistrement auprès des autorités de santé, qui est préparé industriellement selon des normes très strictes (les Bonnes Pratiques de Fabrication) et est vendu par un laboratoire pharmaceutique. Sous son même nom de marque, il existe différentes formes pharmaceutiques et différents conditionnements, chacun faisant l'objet d'un enregistrement spécifique et restera protégé tant qu'il fera l'objet d'une propriété intellectuelle et d'une protection des droits intellectuels et/ou commerciaux (brevet, exclusivité commerciale, licence). Une fois la propriété intellectuelle perdue (épuisement des droits du ou des brevets), le médicament peut être commercialisé sous des formes dites génériques (**Chast, 2016**).

### I.1.4. Formes galéniques d'un médicament

La forme pharmaceutique (également appelée forme galénique) doit permettre à la substance active d'atteindre l'organe visé le plus vite et le mieux possible, c'est un élément important du médicament, car un mode d'administration adapté est gage de meilleure efficacité et de moindre risque.

Il existe un très grand nombre de formes pharmaceutiques. Les plus usuelles sont les formes: (orales, nasales, injectables, dermiques, inhalées, rectales) (**Ph. Eur, 1997**).

### **I.1.4.1. Formes orales**

#### **I.1.4.1.1. Capsules ou gélules**

Les capsules sont des préparations solides constituées d'une enveloppe dure ou molle de forme et de capacité variables contenant généralement une dose unitaire de substances actives (**Pacific, 2006**).

#### **I.1.4.1.2. Comprimés**

Les comprimés sont des préparations solides contenant une unité de prise d'une ou de plusieurs substances. Les particules sont constituées d'une ou de plusieurs substances actives additionnées ou non d'excipients (**Pacific, 2006**).

#### **I.1.4.1.3. Solutions (sirop – gouttes)**

##### **- Sirop**

Les sirops sont des préparations aqueuses, caractérisés par leur saveur sucrée (il peut contenir du saccharose) et leur consistance visqueuse. Ils contiennent généralement des aromatisants ou autres agents de sapidité (**LeHir, 2009**).

##### **- Gouttes**

Le médicament est liquide, donné en flacon, instillé sous forme de goutte avec un compte-goutte, les gouttes sont en générale des calmants prescrits particulièrement dans les maladies nerveuses (**LeHir, 2009**).

### **I.1.4.2. Forme nasale**

Les préparations nasales sont des préparations liquides, semi solides ou solides destinées à l'administration dans les cavités nasales, en vue d'une action locale ou systématique, elles contiennent un ou plusieurs substances actives (**Pacific, 2006**).

### **I.1.4.3. Forme injectable**

Certaines substances actives ne peuvent pas être absorbées par l'intestin (insuline, héparine, vaccin...) ; elles doivent donc être injectées. La voie injectable peut également être utilisée quand on veut obtenir un effet intense et rapide. L'injection est, selon les produits, intramusculaire (pratiquée dans le muscle de la fesse, de l'épaule...), sous-cutanée (pratiquée sous la peau), intraveineuse (pratiquée dans une veine) (**Pacific, 2006**).

### **I.1.4.4. Forme dermique**

Ces formes permettent d'appliquer le médicament sur la peau. Il peut soit agir localement, soit pénétrer à travers la peau et passer dans le sang. Les principales formes pour

application cutanée sont les pommades (préparations grasses), les crèmes (moins grasses), les gels (non gras, limpides), les solutions et les poudres (LeHir, 2009).

#### **I.1.4.5. Forme inhalée**

Les préparations pour inhalation sont des préparations destinées à être administrées dans les poumons sous forme de vapeurs ou d'aérosols en vue d'une action locale ou systémique elles contiennent une ou plusieurs substances actives qui peuvent être dissoutes ou dispersées dans un excipient approprié (LeHir, 2009).

#### **I.1.4.6. Forme rectale**

Le suppositoire permet de traiter des personnes ayant des difficultés à avaler les médicaments ou de traiter localement certaines affections du rectum ou de l'anus (Pacific, 2006).

### **I.2. Présentation des médicaments étudiés**

#### **I.2.1. Présentation de Nebcar<sup>®</sup> (DCI : Nébivolol)**

C'est un médicament générique non obligatoirement stérile produit par l'industrie pharmaceutique El Kendi et contenant le « Nébivolol » comme Principe Actif (PA). Il est sous forme de comprimés pelliculés rose clair de 5 mg et a plusieurs excipients dont le lactose.

Nebcar<sup>®</sup> est un médicament cardiovasculaire appartenant au groupe des bêta-bloquants sélectifs. Il empêche les augmentations du rythme cardiaque et contrôle la force de pompage du cœur. Il exerce aussi un effet dilatateur sur les vaisseaux sanguins, ce qui contribue à réduire la pression artérielle. Ce médicament est utilisé pour traiter l'augmentation de la pression artérielle (hypertension). Nebcar<sup>®</sup> sert également à traiter l'insuffisance cardiaque chronique légère à modérée chez les patients de plus de 70 ans, en association avec d'autres traitements (Ph. Eur, 2008).

##### **I.2.1.1. Propriétés pharmacologiques**

Le principe actif du Nebcar<sup>®</sup> (Nébivolol) est un puissant antagoniste des récepteurs bêta 1 adrénergiques. À doses comparables, il est plus antagoniste que des bêtabloquants de référence, comme l'Aténolol ou le Bisoprolol. Le Nébivolol est une combinaison racémique de D-Nébivolol et de L-Nébivolol. Il semble que le blocage sélectif du bêta-1 récepteur soit conféré essentiellement par le D-Nébivolol. Par contre, les deux énantiomères semblent agir de façon synergique pour baisser la pression artérielle. L'effet bradycardisant est ainsi exercé exclusivement par le D-Nébivolol tandis que l'effet hypotenseur est majoré par l'addition du

L-énantiomère qui, isolément, n'influence pas la pression artérielle (**Logeart et Solal, 2010**). Le Nébivolol a un effet vasodilatateur dépendant de l'endothélium, via la stimulation de la NO Synthase (NOS) endothéliale (**Gao et al., 1991**). Cet effet semble être exclusivement lié au L-énantiomère. Cette activation de la NOS endothéliale passe notamment par l'activation du récepteur bêta-3 adrénergique (**Dessy et al., 2005**), qui entraîne aussi une suppression de la NO synthase inductible et des effets délétères de cette dernière (**Maffei et al., 2007**). Il convient de rajouter dans les spécificités pharmacologiques du Nébivolol, des effets favorables sur le métabolisme glucidique, des propriétés anti-agrégantes et anti-oxydantes lui conférant un intérêt potentiel chez les patients athéromateux (**Munzel et Gori, 2009**) (**Figure 1**).

### **I.2.1.2. Hypertension artérielle (HTA)**

L'hypertension artérielle est un trouble cardiovasculaire qui se caractérise par une pression anormalement élevée du sang sur la paroi des artères. On parle d'hypertension artérielle lorsque la pression artérielle systolique (pression sanguine pendant une contraction cardiaque) excède 140 mm Hg et lorsque la pression artérielle diastolique (pression sanguine entre 2 contractions) excède 90 mm Hg (**Haute Autorité de Santé, 2005**).

De nombreux hypertendus ne présentent aucun symptôme et l'hypertension est alors une découverte d'examen systématique ou de consultation motivée par autre chose.

Dans certains cas, des symptômes peuvent traduire la répercussion de l'élévation de la tension sur l'organisme. Bien que non spécifiques, les principaux symptômes pouvant être rencontrés lors d'une hypertension sont : des céphalées (maux de tête), des acouphènes (sifflements auditifs), des phosphènes (perception de points lumineux), des vertiges, des palpitations (sensation d'augmentation du rythme cardiaque), une asthénie (sensation de fatigue), une dyspnée (difficultés à respirer), une épistaxis (saignements de nez), une hématurie (présence de sang dans les urines) (**Kearney et al., 2005**).

### **I.2.1.3. Insuffisance cardiaque chronique**

L'Insuffisance Cardiaque (IC) est un syndrome clinique complexe qui peut être définie comme une anomalie de la structure ou de la fonction cardiaque conduisant à une défaillance du cœur à livrer l'oxygène à un débit en rapport avec les exigences du métabolisme des tissus malgré des pressions de remplissage normales ou seulement au détriment d'une augmentation des pressions de remplissage (**Lacroix, 2010**).

L'insuffisance cardiaque chronique est la forme la plus fréquente de l'IC. Elle désigne une situation stable dans laquelle le patient peut être asymptomatique ou peut présenter une dyspnée d'effort plus ou moins importante mais stable (**Jondeau, 2006**).

Elle correspond à un état de modification et de remodelage des fibres musculaires du cœur qui se crée sur le long terme. Cette modification est lente et sans aucun signe particulier, elle survient généralement à la suite d'une pathologie initiale(**Jondeau, 2006**).

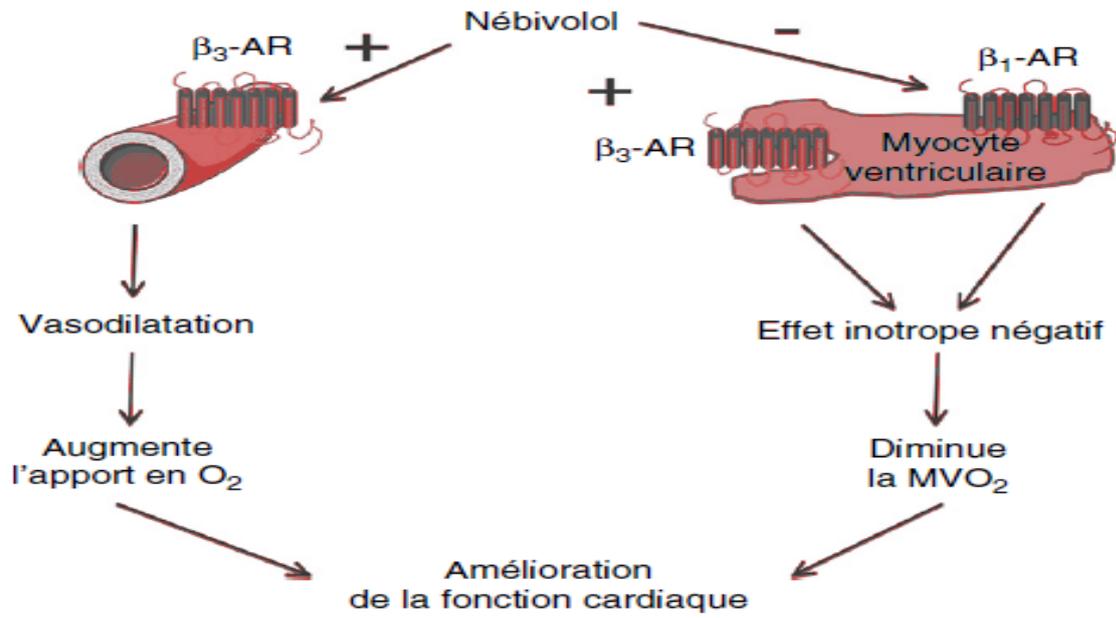
### I.2.2. Présentation d'Abilizole® (DCI : Aripiprazole)

C'est une solution buvable, chaque 1 ml de cette solution contient 1 mg de « Aripiprazole » comme PA. Elle contient également plusieurs excipients dont la glycérine, l'acide lactique, l'hydroxyde de sodium, le propylène glycol, le méthyl parabène, le propyl parabène, EDTA, saccharose, fructose, arôme orange, colorant jaune et l'eau purifiée.

Ce médicament appartient à la famille des médicaments appelés anti-psychotiques. Il est utilisé chez les adultes et les adolescents âgés de 15 ans ou plus pour traiter de la schizophrénie et des épisodes maniaques modérés à sévères, des troubles bipolaires de type I et prévention de récurrences d'épisodes maniaques (**Ph. Eur, 2008**).

#### I.2.2.1. Propriétés pharmacologiques

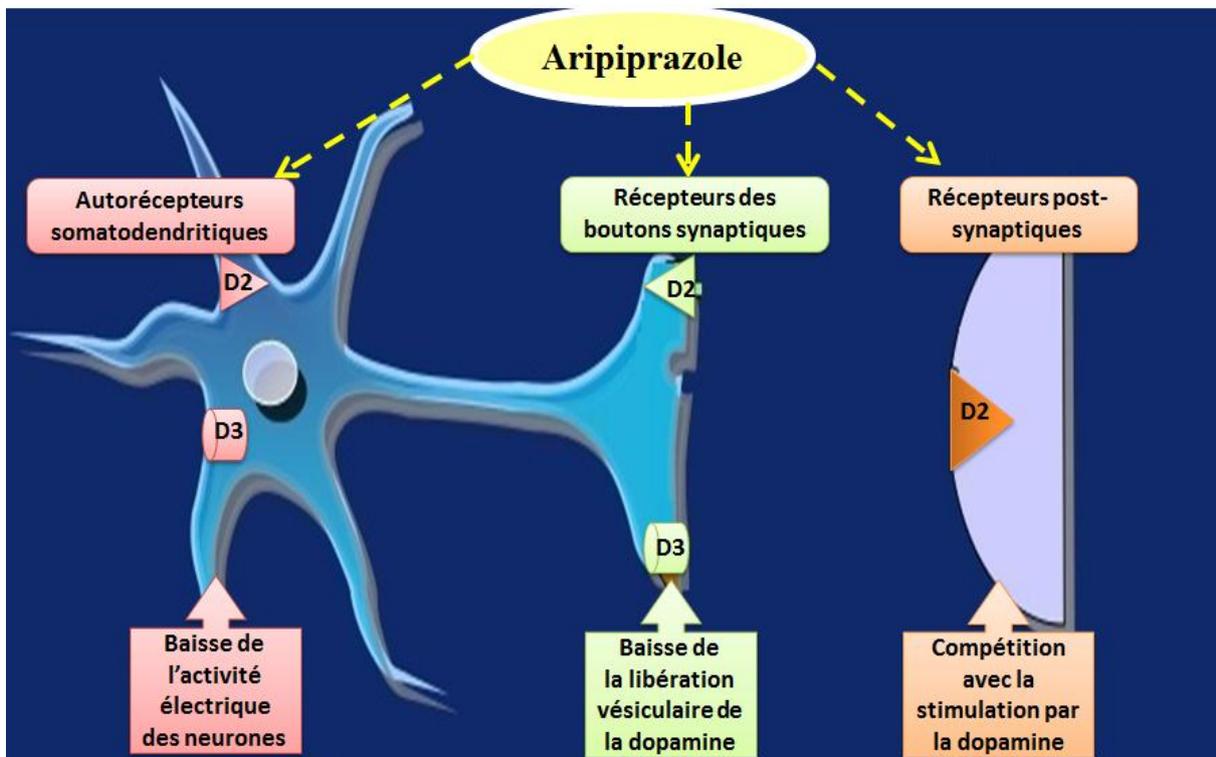
L'Aripiprazole le principe actif d'Abilizole® constitue une stratégie innovante dans la prise en charge thérapeutique de la schizophrénie. Au lieu d'annihiler, comme le font les neuroleptiques conventionnels et les premiers « neuroleptiques atypiques », la transmission dopaminergique excessive qui sous-tend les expressions productives de la schizophrénie, cet agoniste partiel des récepteurs D2 et D3 de la dopamine fixe cette transmission à un niveau modéré (**Limosin et al., 2008; Samalin et al., 2014**). Il réduirait, ce faisant, les expressions positives et corrigerait, en partie, les expressions déficitaires de l'affection. Cette caractéristique de base s'enrichit d'autres propriétés pharmacologiques (antagoniste des récepteurs 5HT2A et agoniste partiel des récepteurs 5HT1A) qui épaulent et/ou complètent les actions thérapeutiques ainsi développées (**FDA, 2014; Shirley et Perry, 2014**). Cet antipsychotique, doté d'un nouveau profil pharmacologique, affecte peu certaines des cibles souvent atteintes par divers autres antipsychotiques (récepteurs cholinergiques muscariniques, récepteurs  $\alpha$ 1-adréniques) ou les modifie sur le mode d'une stimulation légère et non d'un blocage complet (récepteurs D2, D3) ; il s'affranchirait, de ce fait, d'un certain nombre de leurs effets indésirables (**Limosin et al., 2008; Samalin et al., 2014**) (**Figure 2**).



**Figure 1 :** Effets cardiovasculaires du Néбиволол (Gauthier et Trochu, 2010)

$\beta_1$ -AR : Récepteur 1- adrénergique ;  $\beta_3$ -AR : Récepteur 3- adrénergique

$MVO_2$  : Consommation myocardique en oxygène



**Figure 2 :** Mécanisme d'action de l'aripiprazole (Costentin, 2009)

### I.2.2.2. Schizophrénie

C'est une maladie cérébrale et une des plus graves maladies mentales. Les symptômes courant sont des pensées confuses, des délires (croyances fausses ou irrationnelles), des hallucinations (voir ou entendre ce qui n'existe pas) et un comportement bizarre. Ceux qui souffrent de schizophrénie ont des difficultés à accomplir des tâches qui nécessitent une mémoire abstraite et une attention soutenue. Il n'existe aucun test de laboratoire pour diagnostiquer la schizophrénie. Le diagnostic se fonde uniquement sur l'observation clinique. Pour porter un diagnostic sur cette dernière, les symptômes doivent être présents la plupart du temps pendant une période d'au moins 1 mois (**Bassett *et al.*, 1998**).

### I.2.2.3. Episodes maniaques (troubles bipolaires)

Le trouble bipolaire est une maladie chronique dont les retentissements personnels, sociaux et économiques sont nombreux. Il s'agit d'un trouble psychiatrique sévère, multifactoriel, à hérédité complexe et de présentation clinique hétérogène, débutant en général en fin d'adolescence. Les troubles bipolaires ont été classés parmi les dix pathologies les plus invalidantes selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (**Haute Autorité de Santé, 2009**). Les études épidémiologiques ont montré que la prévalence de ces troubles dans la population générale se situe entre 1% si l'on considère le trouble bipolaire dit de type I et 5% si l'on considère l'ensemble du spectre bipolaire(**Scott et Leboyer, 2011**).

Parmi les symptômes maniaques : un trouble de l'humeur, caractérisé surtout par son excès, une élévation (légère) de l'humeur, de l'énergie, de l'énergie sexuelle et de l'activité. La personne a un fort désir de bouger, de rencontrer d'autres personnes et de parler, le besoin de sommeil est souvent réduit, l'agitation peut devenir incontrôlable. L'épisode maniaque peut chez certains être accompagné de symptômes psychotiques (idées délirantes, hallucinations) (**Llorca *et al.*, 2012**).

## I.3. Contrôle de qualité

### I.3.1. Définition de Contrôle

Le mot contrôle peut être utilisé dans le sens de vérification et mesure d'une ou plusieurs caractéristiques d'une entité et de comparer les résultats obtenus à des spécifications préétablies (**Le Hir et Janot, 2001**).

### I.3.2. Définition de la qualité

Selon la norme de l'organisation internationale de normalisation (ISO) , la qualité d'un médicament est l'ensemble des caractéristiques d'une entité qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés et implicites (**Organisation mondiale de santé, 2006**).

### I.3.3. Objectif du contrôle de qualité

Le contrôle de qualité consiste à examiner le respect des bonnes pratiques de fabrication au laboratoire de contrôle, à découvrir les erreurs dépassants les limites tranchées suivant les recommandations de pharmacopées européennes, de manière à corriger les causes.

En général dans tout laboratoire, le contrôle est de vérifier le fonctionnement des appareils, la manipulation ainsi que la précision et l'exactitude d'une technique (**Wehrlé, 2007**).

Le contrôle effectué à des points clés (points critiques) évite d'engager inopportunément des frais couteux dans la suite des opérations. En effet, le contrôle final détermine la conformité du produit aux objectifs et le contrôle de la conformité ont pour finalité de confirmer que le produit fabriqué localement ou importé répond aux normes homologuées et /ou aux spécifications légales et réglementaires qui le concernent, et en particulier aux prescriptions de l'article 3 de la loi n 89 - 09 de 07 février 1989 (analyses de qualité, contrôle de conformité) : Décret exécutif n° 92 - 65 au 12 février 1992 relatif au contrôle de la conformité des produits fabriqués localement ou importés (**Vadeville, 1983**).

### I.3.4. cinq M

Pour éviter les risques de non qualité qui peuvent survenir en cours de fabrication et de conditionnement et ainsi maîtriser la qualité, il est mis en place selon les BPF la règle des 5M dont la qualification fait partie intégrante. L'observance de cette règle vise à garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité du produit (**Ernoul, 2013**).

- ✓ **Matières** : elles doivent être définies, analysées et conformes aux normes.
- ✓ **Milieu** : les locaux doivent être adaptés. l'environnement doit être maîtrisé selon sa criticité.
- ✓ **Main d'œuvre** : le personnel doit être qualifié, motivé et formé.
- ✓ **Méthodes** : elles doivent être décrites avec précision d'où l'importance d'un système documentaire adéquate.
- ✓ **Matériel** : les moyens matériels doivent être adaptés, réglés, étalonnés et listés afin de convenir à l'usage prévu. La maintenance et le nettoyage de tous les appareils sont très importants et la qualification va prouver et démontrer que l'équipement a été bien installé, fonctionne correctement et conduit aux résultats attendus.

### I.3.5. Différents types de contrôle de qualité

#### I.3.5.1. Contrôle physico-chimique

La conformité du médicament aux normes et sa validité sont examinées par plusieurs méthodes analytiques qualitatives et quantitatives, telles que les dosages volumétriques, les dosages par spectrophotométrie UV/visible et l'analyse par différentes méthodes chromatographiques en l'occurrence, la technique de Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC), la spectrophotométrie infrarouge (**Albert et al. 1974 ; Ph. Eur., 2014**).

#### I.3.5.2. Contrôle microbiologique

Les contrôles microbiologiques doivent permettre de garantir une bonne qualité hygiénique et marchande du produit fabriqué, et minimisent les pertes dues aux mauvaises conditions de fabrication (Scriban, 1999). Les essais microbiologiques ont été conçus pour le dénombrement des bactéries mésophiles, des moisissures et des levures capables de croître en aérobiose. Ces essais sont en premier lieu destinés à déterminer, si un produit faisant l'objet d'une monographie de la pharmacopée satisfait aux exigences microbiologiques spécifiées dans cette monographie. Le choix de la méthode est déterminé par des facteurs, tels que la nature du produit et le nombre de microorganismes présumé. Quelle que soit la méthode choisie, elle doit être convenablement validée (**Ph. Eur, 2014**).

### I.3.6. Contamination microbiologique ou bio-contamination

On entend par bio-contamination « la contamination d'une matière, d'un appareil, d'un individu, d'une surface, d'un liquide, d'un gaz ou de l'air par des particules viables » (**ISO, 2003**).

Ce type de contaminants regroupe les micro-organismes (MO) vivants tels que les levures, moisissures, bactéries. Ces organismes ont besoin, pour se développer et se multiplier, de conditions d'humidité et de chaleur. Nous devons donc veiller à maîtriser ces différents paramètres afin de minimiser le risque de développement de MO.

La présence de MO dans les préparations stériles peut engendrer différents problèmes. D'une part ils peuvent être responsables d'une altération de l'aspect, de l'odeur voir du goût d'un produit. D'autre part, si des MO pathogènes ou toxiques sont présents, ils peuvent transmettre leur pouvoir pathogène ou toxique au patient ainsi certains MO peuvent relarguer des endotoxines qui sont responsable de l'effet pyrogène. Ces derniers sont surtout des bactéries à Gram négative, car elles disposent d'une membrane externe riche en lipopolysaccharides (LPS). Le LPS contient un liquide appelé lipide A. Lors de la lyse de la bactérie, ce lipide A

va se retrouver dans l'environnement et potentiellement peut être transporté jusque le produit à répartir. Le lipide A une fois dans le corps humain va être phagocyté par les macrophages ce qui va induire une réaction immunitaire de type inflammatoire, dont l'effet pyrogène est un des effets (**Rietschel *et al.*, 1994; Mugoyela et Mwambete, 2010**).

Les microorganismes peuvent être détectés et quantifiés par des techniques de microbiologie (empreinte sur support gélosé, frottis,...). Ils peuvent avoir deux origines :

- Une origine exogène : les MO proviennent de l'environnement ou d'un contact direct avec l'être humain.
- Une origine endogène : les MO proviennent de ce qui est contaminé.

### **I.3.7. Modalités de contrôle en industrie pharmaceutique**

#### **I.3.7.1. Contrôle des matières premières**

Celles-ci interviennent dès le début du processus de fabrication, il est donc indispensable que leur qualité microbiologique soit vérifiée. De plus, elles sont souvent coûteuses. L'industriel a donc l'obligation de les contrôler dès réception, et de fournir un certificat d'analyse prouvant la conformité de la charge microbienne (en UFC/g ou UFC/ml). Il doit également les stocker et les utiliser dans un environnement propre (**BPF, 2011**).

#### **I.3.7.2. Contrôle de l'eau**

L'eau purifiée est la plus utilisée dans l'industrie pharmaceutique. Elle est utilisée en tant qu'excipient pour reconstituer un médicament lors des étapes de synthèse du PA ou de la formulation du produit fini ou comme élément principal de nettoyage des cuves, des équipements ou des emballages primaires. Différentes qualités d'eau sont nécessaires selon l'utilisation qui en serait faite. Les différentes qualités d'eau se différencient par leur pureté physico-chimique et microbiologique. Les pharmacopées décrivent ces qualités requises pour chacune des eaux « monographies » et les méthodes d'analyse pour accepter leur conformité et leur mode de génération (**Pignatti *et al.*, 2002**).

#### **I.3.7.3. Suivi environnemental**

La fabrication des médicaments stériles doit obligatoirement se faire dans des Zones d'Atmosphère Contrôlées (ZAC). On entend par ZAC une pièce dont « le contrôle de la contamination particulaire et microbienne dans l'environnement est défini, construit et utilisé de façon à réduire l'introduction, la multiplication ou la persistance de contaminants » (**BPF, 2011**).

#### **I.3.7.4. Contrôle microbiologique de l'air**

L'air est un important vecteur de contaminations. On y trouve surtout des bactéries à Gram + (*Micrococcus*, *Bacillus*), et des spores de champignons. Les micro-organismes de l'air sont présents sur des particules de plus grande taille (squames, microgouttelettes de salive, poussières). Afin de garantir un contrôle de l'air, l'équipement de traitement de l'air doit être requalifié au moins une fois par an, l'environnement devrait se conformer aux limites des non-viables et viables ainsi la vérification de l'intégrité du filtre et des flux d'air ambiant doit être effectuée (**World Health Organization, 2011**).

#### **I.3.7.5. Contrôle du personnel**

Le personnel est un vecteur potentiel important de contamination croisée. Tous les membres du personnel doivent être conscients des principes des bonnes pratiques de fabrication qui les concernent. Les BPF leur consacrent même un chapitre entier : le chapitre 2 (**BPF, 2011**). L'hygiène du personnel est primordiale pour réduire le risque de contamination des produits fabriqués. Le respect de ces règles d'hygiène doit être observé par tout individu pénétrant dans les zones de fabrication et de contrôle. Les techniques d'habillement, de lavage et de désinfection des mains et l'utilisation des sas sont acquises par le personnel et elles sont consignées dans les procédures (**World Health Organization, 2011**).

#### **I.3.7.6. Contrôle du produit**

Les industries réalisent des tests microbiologiques tout au long de processus de fabrication sur le produit afin de maîtriser au mieux la bio-contamination et d'obtenir un résultat acceptable sur le produit fini. Pour cela, le procédé de fabrication est étudié en détail, les étapes dites « critiques » sont sélectionnés afin de réaliser des analyses microbiologiques sur le produit intermédiaire. Des spécifications en interne sont alors établies: la contamination résiduelle obtenue sur le produit intermédiaire doit être inférieure à la limite préalablement fixée.

En termes microbiologiques, les produits pharmaceutiques peuvent être divisés en deux groupes: stérile et non obligatoirement stérile (**Ratajczak et al., 2015**).

##### **I.3.7.6.1. Produits stériles**

Ce sont des préparations obligatoirement stériles aux termes de la monographie de la forme pharmaceutique correspondante. L'essai de stérilité est appliqué pour cette détermination (**Ph. Eur, 2010**).

### **I.3.7.6.2. Produits non obligatoirement stériles**

Les médicaments non stériles doivent satisfaire aux critères de pureté microbiologique appropriés inclus dans les monographies des pharmacopées. Des études de pharmacopée sont préparées spécifiquement en vue de s'assurer que le médicament est efficace sur le plan thérapeutique et sans danger pour la santé.

Les critères d'acceptation applicables aux produits pharmaceutiques non obligatoirement stériles sur la base : du dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) et du dénombrement des moisissures/levures totales (DMLT), la présence ou l'absence des microorganismes pathogènes spécifiques (**Tableau 1**).

## **I.4. Validation des méthodes d'analyse en industrie pharmaceutique**

### **I.4.1. Définition de la validation**

La validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée.

La validation s'applique aux méthodes utilisées pour examiner les caractéristiques chimiques et physico-chimiques d'un produit, mais également les méthodes microbiologiques et biologiques(**OMS, 1998**). La validation doit être réalisée pour une nouvelle méthode ou pour l'application de cette méthode sur un nouveau produit (**Riley, 2004**).

Avant de procéder à une validation, certains facteurs doivent être maîtrisés. Selon les Bonnes Pratiques de fabrication il faut : D'abord définir un système de management de qualité (responsabilités à définir, attentes, objectifs système documentation ...), ensuite déterminer les points critiques du protocole (expression du résultat, préparation de l'échantillon ....) puis le matériel requis (étalonnage, vérification, qualification) et enfin l'environnement (locaux, eau, air...) (**USP, 2012**).

**Tableau 1:** Critères d'acceptation de la qualité microbiologique des formes pharmaceutiques non stériles (Ph. Eur, 2010)

Voies d'administration	DGAT (UFC/g) ou (UFC/ml)	DMLT (UFC/g) ou (UFC/ml)	Microorganismes spécifiés
<b>Voie orale : préparation non aqueuse</b>	$10^3$	$10^2$	Absence de : d' <i>Escherichia Coli</i> (1g ou 1ml)
<b>Voie orale : préparation non aqueuse</b>	$10^2$	$10^1$	Absence de : d' <i>Escherichia Coli</i> (1g ou 1ml)
<b>Voie rectale</b>	$10^3$	$10^2$	
<b>Voie buccal Voie gingivale Voie cutanée Voie nasale Voie auriculaire</b>	$10^2$	$10^1$	Absence de : <i>Staphylococcus aureus</i> (1g ou 1ml) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1g ou 1ml)
<b>Voie vaginale</b>	$10^2$	$10^1$	Absence de : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1g ou 1ml) <i>Staphylococcus aureus</i> (1g ou 1ml) <i>Candida albicans</i>
<b>Voie transdermique (limite pour un dispositif transdermique, film protecteur et support compris)</b>	$10^2$	$10^1$	Absence de : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1g ou 1ml) <i>Staphylococcus aureus</i> (1g ou 1ml)
<b>Inhalation (des exigences spécifiques s'appliquent aux préparations liquides dispensées au moyen de nébuliseurs)</b>	$10^2$	$10^1$	Absence de : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1g ou 1ml) <i>Staphylococcus aureus</i> (1g ou 1ml) Bactéries gram négatives résistantes aux sels biliaires (1g ou 1ml)
<b>Disposition spéciale de la Ph.Eur. Pour les préparations pour administration par voie orale contenant des matières premières d'origine naturelle (animale, végétale ou minérale), lorsqu'un prétraitement antimicrobien est impossible et que l'autorité compétente admet une DGAT des matières premières supérieurs à 103 UFC/g ou UFC/ ml.</b>	$10^4$	$10^2$	Au maximum $10^2$ UFC de bactéries gram négatives résistantes aux sels biliaires (1g ou 1ml).  Absence de : salmonelles (10g ou 10 ml). d' <i>Escherichia coli</i> (1g ou 1ml) <i>Staphylococcus aureus</i> (1g ou 1ml)

### I.4.2. Caractéristiques des méthodes analytiques

Chaque méthode d'analyse possède un certain nombre de propriétés caractéristiques, critères qui qualifient les performances de la méthode à savoir : l'exactitude, la précision, la répétabilité, la reproductibilité, la robustesse, la linéarité, la sensibilité, la capacité de détection, la sélectivité. Toutes ces caractéristiques ne sont pas applicables à toutes les méthodes d'essai ou à tous les produits à analyser. Cela dépend en grande partie du but de l'analyse (OMS, 1998). En effet, la validation des méthodes microbiologiques correspond à l'étude scientifique des critères de fiabilité des techniques microbiologiques : limite de détection, linéarité, reproductibilité, répétabilité (USP, 2012).

- Limite de détection (LD): Le plus petit nombre de microorganismes détectables par la méthode. La LD est essentielle pour définir ce qui est considéré comme contaminé. La LD est déterminée en inoculant des échantillons avec des dilutions en série de contaminants viables, avec des unités formant des colonies (CFU) confirmées à l'inoculation par comptage des plaques.
- Précision et répétabilité: La proximité entre la valeur mesurée et la valeur réelle de la quantité de micro-organismes. Accord entre les résultats d'essais individuels pour des échantillonnages multiples à partir d'un échantillon homogène.
- Linéarité: La linéarité est la capacité (dans une plage donnée) à obtenir une détection directement proportionnelle à la CFU d'un micro-organisme dans un échantillon.
- Spécificité: La capacité de la méthode d'essai à détecter un panel d'organismes (Peris-Vicente *et al.*, 2015).

### I.4.3. Intérêts de la validation des méthodes de contrôle microbiologique

La validation permet de rationaliser les équipements et les opérations de production, de limiter le nombre de rejets pour non-conformité et de diminuer le nombre de contrôles finaux sur les produits fabriqués. Il y a donc reproductivité d'un procédé et augmentation de la productivité (LeHir et Brossard, 1997).

- Assurer la conformité avec les réglementations nationales et internationales, surtout en industrie pharmaceutique où les méthodes d'analyse fiables sont requises.
- Apporter des preuves formelles que la procédure analytique est non seulement appropriée à l'usage auquel elle est destinée mais aussi suffisamment fiable pour que toute décision basée sur le résultat analytique obtenu soit prise en toute conscience.

- Etablir que les micro-organismes éventuellement présents dans le produit à examiner peuvent être détectés en présence de ce dernier.
- S'assurer que les micro-organismes mis en évidence dans le produit à examiner ne proviennent pas des milieux et de l'environnement (**USP, 2012**).

**MATÉRIEL**

**ET**

**MÉTHODES**

## II. Matériel et méthodes

Afin de réaliser les méthodes d'analyses microbiologiques, le laboratoire de contrôle qualité des produits pharmaceutiques d'El kendi dispose de différent matériel cité ci-dessous.

### II.1. Matériels d'études

#### II.1.1. Matériel biologique

##### ➤ Souches bactériennes

Les différentes souches utilisées dans la validation de la méthode d'analyses microbiologiques des produits pharmaceutiques non obligatoirement stériles sont recommandées par la Pharmacopée Européenne (**Tableau 2**) et proviennent du centre des ressources biologiques de l'institut Pasteur français (**annexe 1**).

**Tableau 2** : Références des souches utilisées dans la validation

Souches	Références	Espèces
<b>Bactéries</b>	CIP 53.126.	<i>Escherichia coli</i>
	CIP 82.118.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	CIP 4.83.	<i>Staphylococcus aureus</i>
	CIP 52.62.	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>Levure</b>	CIP 53.126.	<i>Candida albicans</i>
<b>Champignon</b>	CIP 1431.38.	<i>Aspergillus niger</i>

**CIP** : Collection du Centre Institut Pasteur de France.

#### II.1.1. Matériel non biologique

L'ensemble des équipements spécifiques (verrerie et appareillage) utilisés dans cette étude sont présentés dans l'**Annexe 2**.

##### ➤ Milieux de culture

Le milieu de culture est une préparation au sein de laquelle les micro-organismes peuvent se multiplier. Il doit donc satisfaire les exigences nutritives du micro-organisme et offre les conditions favorables à la croissance microbienne. Les milieux utilisés (**Tableau 3**) ainsi que les diluants tels que la solution tampon peptonée au chlorure de sodium et le polysorbate 80 «tween 80» sont fournis par l'entreprise «Biomerieux» (France).

**Tableau 3 :** Milieux de culture utilisés

	Dénomination	Composition
<b>Milieux de culture généraux</b>	TSA : Trypticase Soja Agar	<b>Annexe 3</b>
	SDA : Sabouraud Dextrose Agar	
	TSB : Trypticase Soja Broth	
<b>Milieux de culture sélectifs</b>	MCA : Mac Conkey Agar	
	MCB : Mac Conkey Broth	
	R2A : Reasoners 2 Agar	
	Gélose au Cétrimide	

### ➤ Produits étudiés

Deux produits pharmaceutiques finis non obligatoirement stériles, à administration orale, de deux formes galéniques différentes ont fait l'objet de notre étude. Ces deux médicaments n'ont pas encore été enregistrés au niveau du Ministère de la Santé pour une éventuelle commercialisation.

- Abilizole<sup>®</sup> : est un médicament antipsychotique en forme de suspension qui appartient à la classe des bloqueurs dopaminergiques (**Figure 3**).
- Nebcar<sup>®</sup> : est un médicament antihypertenseur en forme de comprimé qui appartient à la classe des bêta bloquants. (**Figure 3**).

Tout produit fabriqué par l'industrie pharmaceutique «El Kendi Pharmaceutical Manufacturing Company» nécessite un contrôle qu'on appelle la propreté microbienne.

## II.2. Méthodes

Afin d'atteindre l'objectif de cette étude, une démarche expérimentale enchaînée a été entreprise, cette démarche est récapitulée dans **la figure 4** et détaillée ci-après :



**Figure 3 :** les produits analysés Nebcar<sup>®</sup> et Abilizole<sup>®</sup> (Originale, 2018)

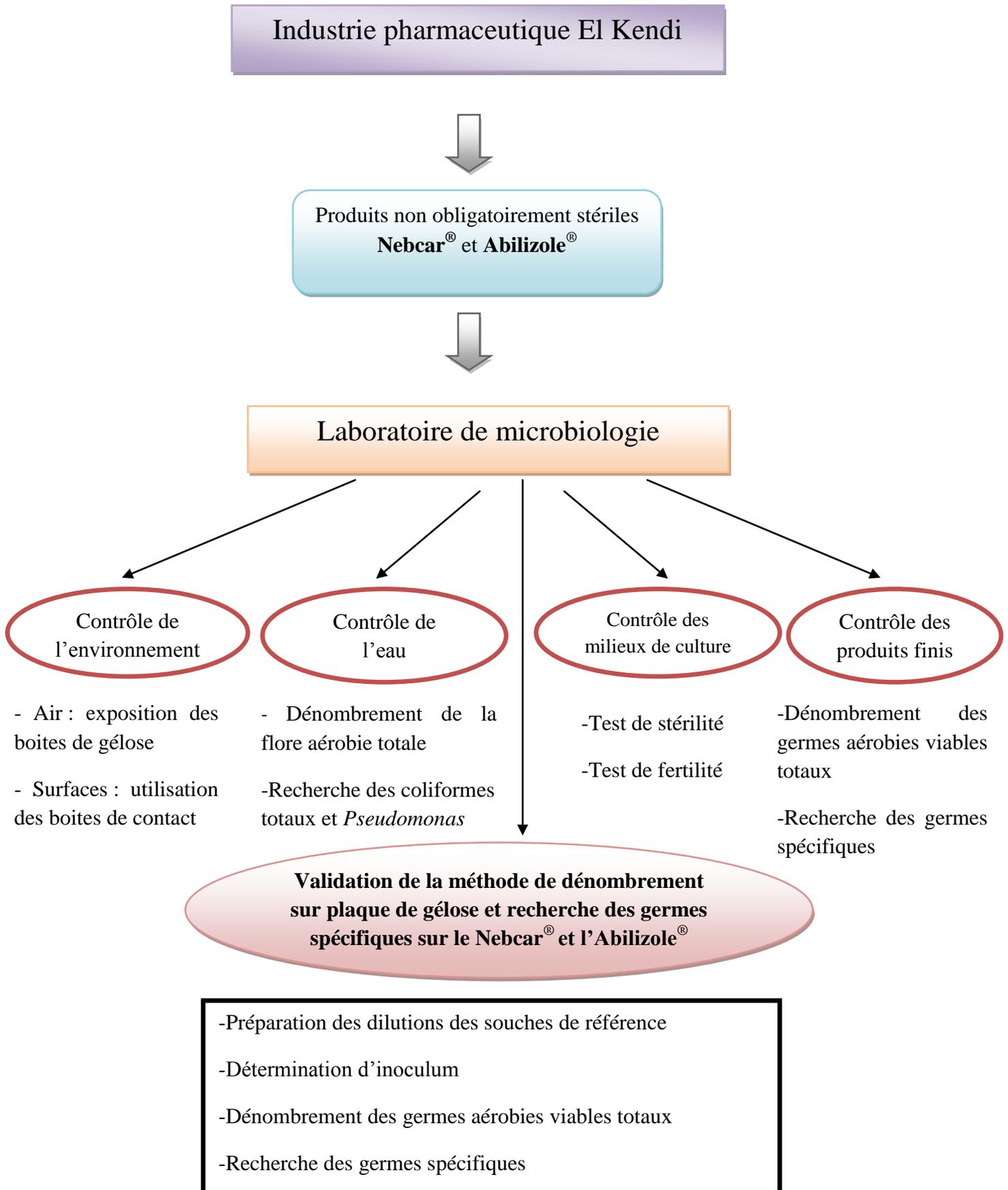


Figure 4 : Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale (Originale, 2018)

### **II.2.1. Préparation des milieux de culture**

La réalisation des tests microbiologiques est assurée en utilisant des différents milieux de culture qui peuvent être usuels, spécifiques ou d'enrichissement préparés à partir d'une poudre ou des cristaux.

Le résultat de ces tests dépend de la qualité de préparation ainsi que la stérilisation des milieux utilisés.

#### **II.2.1.1. Etapes de préparation**

Le milieu sous forme de poudre ou cristaux est repris dans un volume d'eau purifiée inférieur au volume nécessaire. La dissolution du milieu se fait sous agitation, cette dernière est complétée d'un chauffage pour les milieux gélosés. Le volume adéquat est ensuite ajusté avec de l'eau purifiée et le milieu est conditionné puis stérilisé dans un cycle d'autoclavage (20 minutes de phase de stérilisation à 121°C). On mesure et ajuste si nécessaire le pH par addition de NaOH (solution acide) ou HCl (solution basique) stériles afin d'obtenir le pH indiqué par le fournisseur. Enfin, on identifie des flacons et tubes de conditionnement par étiquetage et conserve au froid (2-8°C). La validité des milieux est de 1 mois pour les milieux coulés dans les flacons (à partir du jour de la préparation) et de 15 jours pour ceux qui sont conditionnés dans les boîtes de Pétri (placées dans des emballages scellés).

### **II.2.2. Contrôle de la qualité des milieux de culture**

L'utilisation des milieux est conditionnée par la réalisation de deux tests assurant leur qualité : les tests de stérilité et fertilité.

#### **II.2.2.1. Test de stérilité**

L'étude de la stérilité des milieux de culture utilisés, qu'ils soient solides ou liquides, consiste à les incuber à des températures appropriées pour la croissance microbienne. L'absence de la croissance indique que les milieux sont stériles et par conséquent, ils peuvent être utilisés. Ce test permet d'éliminer les résultats faux positifs.

#### **II.2.2.2. Test de fertilité**

##### **II.2.2.2.1. Préparation de la solution mère des souches**

Les souches de référence sont sous forme lyophilisée et c'est avec des tubes contenant du TSB qu'elles sont reconstituées. Ces tubes sont incubés à 35°C pendant 24h par la suite une série de dilution décimale est effectuée à partir des suspensions mères en transférant 1mL de cette dernière dans 9mL de solution tampon peptonée à pH7 (action répétée jusqu'à la

dernière dilution). Ces dilutions permettront la réalisation du test de fertilité des différents milieux.

#### II.2.2.2.2. Fertilité des milieux de culture généraux et sélectifs

Le test de fertilité consiste à contrôler de la performance nutritionnelle des milieux de culture afin de s'assurer que ces derniers rassemblent les conditions favorables à une prolifération normale des microorganismes. Ainsi, pour chaque milieu utilisé, des volumes précis (**Annexe 4**) des souches de référence sont ensemencées (inoculum qui correspond à la charge microbienne inférieur ou égale à 100 UFC/ml) puis incubés à leurs températures optimales de croissance pendant un temps déterminé. La fertilité des milieux est exprimée selon le type du milieu testé :

- en calculant le facteur F pour les milieux solides généraux :  $F = \frac{UFC \text{ calculées}}{UFC \text{ standardisées}}$  (avec  $F \leq 2$ ).
- Par observation de la présence ou absence des colonies, pour les milieux sélectifs solides.
- Par observation de la présence ou absence de troubles pour les milieux liquides généraux ou sélectifs.

Les résultats obtenus sont comparés à des valeurs standardisées fixes obtenues après plusieurs essais au laboratoire de microbiologie d'El Kendi (**Tableau 4**).

**Tableau 4** : Les valeurs standardisées des souches de référence

Milieux	Souches	Standard UFC/mL
TSA	<i>P.aeruginosa</i>	97
	<i>S.aureus</i>	101
	<i>B.subtilis</i>	101
	<i>C.albicans</i>	106
	<i>A.niger</i>	90
SDA	<i>C.albicans</i>	106
	<i>A.niger</i>	100

#### II.2.3. Contrôle microbiologique de l'eau

La qualité microbiologique de l'eau a une grande influence sur la contamination des produits pharmaceutiques, par conséquent il est essentiel de choisir des récipients adaptés

pour les échantillons afin d'éviter toute contamination lors de leur prélèvement et ainsi réduire le risque d'éventuels résultats « faux positifs ». On utilise le plus souvent les matières en verre de borosilicate ou le plastique de bonne qualité (USP, 2018).

### II.2.3.1. Procédé de contrôle microbiologique de l'eau

#### ➤ Dénombrement de la flore aérobie totale

Pour réaliser ce dénombrement sur boîte de Pétri, on utilise la rampe de filtration ainsi on place tout d'abord le filtre stérile de nitrocellulose (0,45  $\mu\text{m}$ ) et on attache l'entonnoir au support de filtre. On secoue la bouteille de l'échantillon avant de filtrer 100 ml à l'aide d'un aspirateur. Le transfert du filtre sur le milieu R2A (eau purifiée et eau potable) se fait aseptiquement avec une pince stérile. Ensuite on incube la boîte de Pétri à 33-35 °C pendant 3 à 5 jours.

Le comptage des colonies sur le filtre se fait au moyen d'un compteur de colonies et on divise par 100 pour exprimer comme UFC/ml. Les boîtes sans colonies sont signalées comme <1UFC/100mL. Et s'il y a lieu d'identification bactérienne, elle s'effectue en utilisant des kits biochimiques.

#### ➤ Recherche des coliformes totaux

Pour la recherche des coliformes totaux dans l'eau potable la même opération que précédemment (Dénombrement de la flore aérobie totale) a été entreprise sauf que cette fois le milieu MCA a été utilisé et on incube à 33-35 °C pendant 3 à 5 jours ainsi la présence ou l'absence des coliformes totaux a été déterminée par l'absence ou présence d'une coloration rose

#### ➤ Recherche de *Pseudomonas*

La même démarche a été réalisée pour la recherche de *Pseudomonas* dans l'eau potable sauf que cette fois un filtre de nitrocellulose de 0,22  $\mu\text{m}$  a été déposé sur le milieu cétrimide et on incube à 33-35 °C pendant 3 à 5 jours ainsi la présence ou l'absence de *Pseudomonas* a été déterminée par l'absence ou présence d'une coloration vert pistache.

### II.2.4. Contrôle microbiologique de l'environnement

La mise en œuvre des prescriptions réglementaires des différentes pharmacopées fait partie intégrante de la garantie d'un environnement de production hygiénique. L'expérience

en matière de prise d'échantillons et l'évaluation des résultats sous l'angle de la gestion du risque sont des facteurs de réussite pour remplir les normes d'hygiène. La numération des germes doit être effectuée par un laboratoire accrédité BPF (USP, 2008).

#### II.2.4.1. Méthode de contrôle

La surveillance de routine est effectuée à l'aide d'un milieu de croissance microbiologique général, comme la gélose à base de caséine de soja TSA et SDA. L'USP 2018 décrit :

##### ➤ Méthode d'exposition des boîtes de gélose

Les boîtes de gélose préalablement coulées des milieux TSA sont placées sur le sol ou une surface. On expose ces boîtes pendant 4 heures afin de permettre le dépôt des particules en suspension. C'est une méthode directe d'évaluation du nombre probable des microorganismes se déposant sur le produit ou la surface. On note les informations correctes sur la base des boîtes (la partie contenant le support) avec un marqueur indélébile avant de les incuber à 33-35°C pendant 3-5 jours. Le comptage des unités de formation des colonies (UFC) s'effectue à l'aide d'un compteur de colonies.

##### ➤ Surveillance des surfaces par utilisation des boîtes de contact

Pour déterminer l'efficacité des procédures de nettoyage de routine, on utilise des boîtes de contact. L'échantillonnage doit être effectué avant et après le nettoyage pour déterminer l'efficacité de la procédure de nettoyage.

Les boîtes de contact standard (RODAC : Détection et Comptage d'Organismes Répliqués) contiennent suffisamment de milieu de croissance créant une surface de support surélevé.

Les informations suivantes doivent être nécessairement inscrites sur les boîtes : les initiales de l'opérateur qui a recueilli le prélèvement, la date et l'heure de la prise de prélèvement et l'emplacement de l'échantillon.

Cette surveillance revient à mettre en contact le maximum de la surface de gélose avec le point de prélèvement pendant 10 secondes en appliquant une force constante répartie uniformément sans tordre, glisser et éviter la création de bulles. La surface ainsi testée est nettoyée avec de l'alcool 70% pour enlever toute trace possible d'agar résiduel. Le milieu utilisé contient des agents neutralisants (tween 80 à 2%) qui inactivent tous les désinfectants résiduels sur la surface à tester. Les boîtes TSA sont incubées à 33-35°C pendant au moins 2 jours.

On note que cette méthode n'est appropriée que pour une surface inaccessible ou irrégulière et que les boîtes de contact ont une faible récupération d'échantillon et ne soumettent qu'un pourcentage de la surface réelle.

### **II.2.5. Contrôle microbiologique des produits pharmaceutiques non obligatoirement stériles**

Le contrôle microbiologique a pour objectif de garantir la qualité des produits pharmaceutiques. Les produits à analyser sont un antipsychotique et un antihypertenseur et nécessitent le dénombrement des germes aérobies viables totaux, les levures et moisissures ainsi que la recherche d'*E.coli* en tant que germe spécifique.

#### **II.2.5.1. Dénombrement des germes aérobies viables totaux**

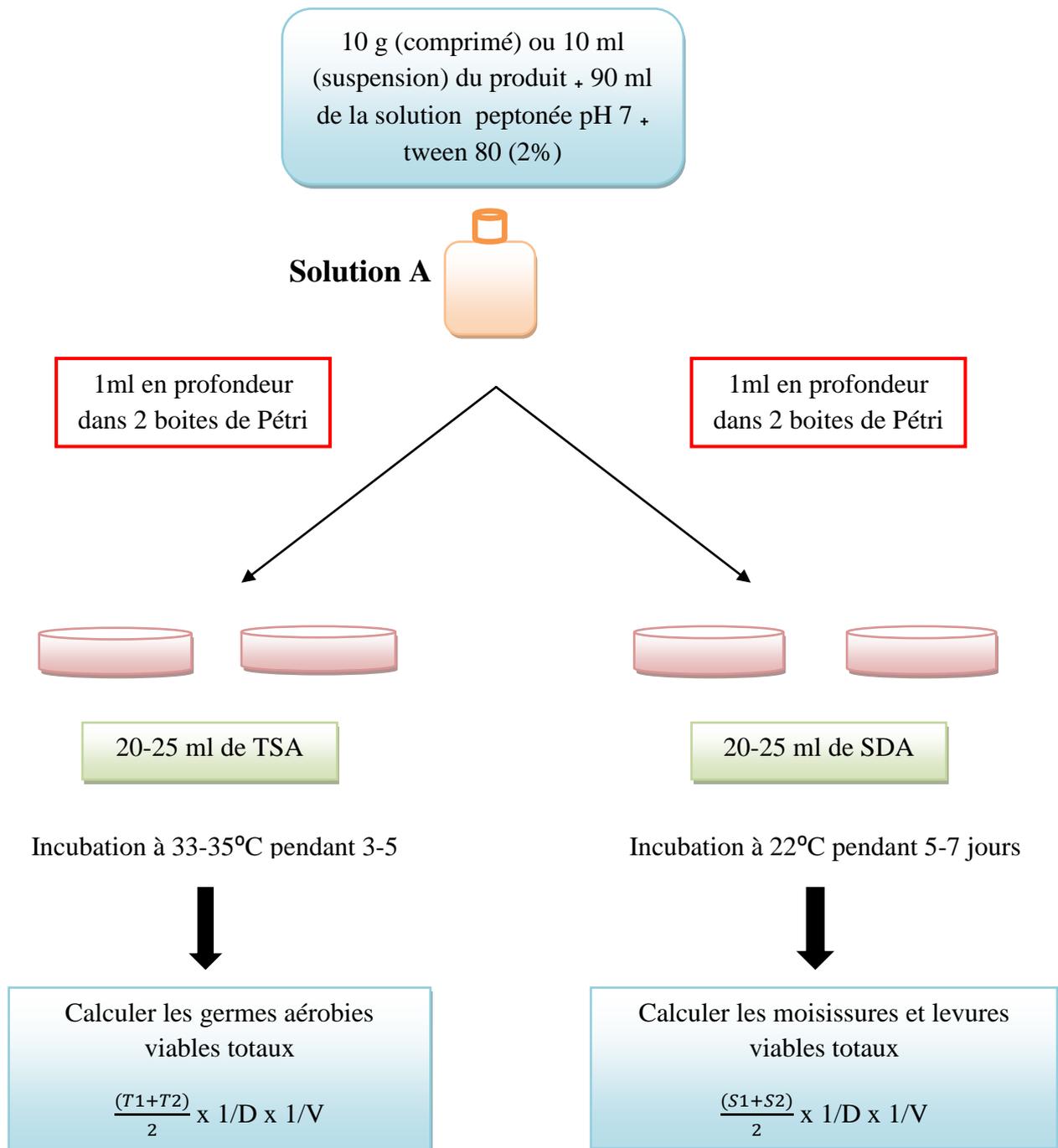
Le dénombrement des germes dans les produits finis consiste à préparer l'échantillon à analyser et à ensemencer un volume de la solution obtenue sur les différents milieux de culture utilisés. Pour le Nebcar<sup>®</sup> et Abilizole<sup>®</sup>, la Pharmacopée Américain (2018) recommande l'utilisation d'une solution tampon peptonée au chlorure de sodium à pH 7 (diluant) additionnée du tween 80 (2%) comme tensioactif.

#### **II.2.5.2. Protocole d'analyse microbiologique**

Le produit à analyser (10 g du comprimé Nebcar<sup>®</sup> ou 10 ml du suspension Abilizole<sup>®</sup>) sont prélevés dans un flacon gradué stérile et on ajuste le volume jusqu'à 100 ml de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium à pH7 (dilution décimale 1/10 solution A) avec du tween 80 (2%) pour faciliter la mise en suspension.

Après dissolution des produits, 1 ml est prélevé de la préparation puis ensemencé en profondeur dans chacune des 4 boîtes de pétri. On coule ensuite 20 à 25 ml des milieux en surfusion (ne dépassant pas 45) : le milieu TSA dans deux boîtes et le SDA dans les deux autres boîtes. On effectue par la suite le contrôle négatif (témoin) du diluant pH7 additionné au tween 80 à 2% en ensemencant 1 ml en profondeur dans 2 boîtes qui seront coulées de TSA et SDA. L'incubation des boîtes TSA se fait à 33-35°C pendant 3-5 jours et celles du SDA à 22-25°C pendant 5-7 jours. Enfin la lecture se fait à l'œil nue à l'aide d'un compteur des colonies (**Figure 5**).

La procédure est la même pour les dilutions 1/50 et 1/100.



**Figure 5:** Schéma des étapes de contrôle microbiologique (dénombrement des germes aérobies viables totaux) pour les deux produits Nebcar<sup>®</sup> et Abilizole<sup>®</sup> par la méthode de dénombrement sur plaque de gélose (Originale, 2018)

### II.2.5.3. Recherche des germes spécifiques

Pour mettre en évidence la présence ou l'absence d'*E.coli* dans les produits finis Nebcar<sup>®</sup> et Abilizole<sup>®</sup> on procède comme suit : Prélever 10 ml du produit dilué (solution A) et ajouter de bouillon de pré-enrichissement TSB puis incuber à 33-35°C pendant 24h. Au terme de l'incubation, prélever 1 ml du milieu TSB et ajuster jusqu'à 100 ml avec le milieu MCB pour l'incuber à 42°C pendant 24h. Enfin réaliser des stries à l'aide d'une anse de platine calibrée sur la gélose MCA. Cette dernière est incubée à 33-35°C pendant 24h (**Figure 6**).

Les colonies d'*Escherichia coli* apparaissent en rose fushia.

### II.2.6. Validation de la méthode de dénombrement sur plaque de gélose et recherche des germes spécifiques dans Nebcar<sup>®</sup> et Abilizole<sup>®</sup>

Dans le domaine pharmaceutique, la validation des méthodes analytiques microbiologiques est imposée par les pharmacopées afin de garantir la qualité et la fiabilité des résultats.

#### II.2.6.1. protocole de la validation

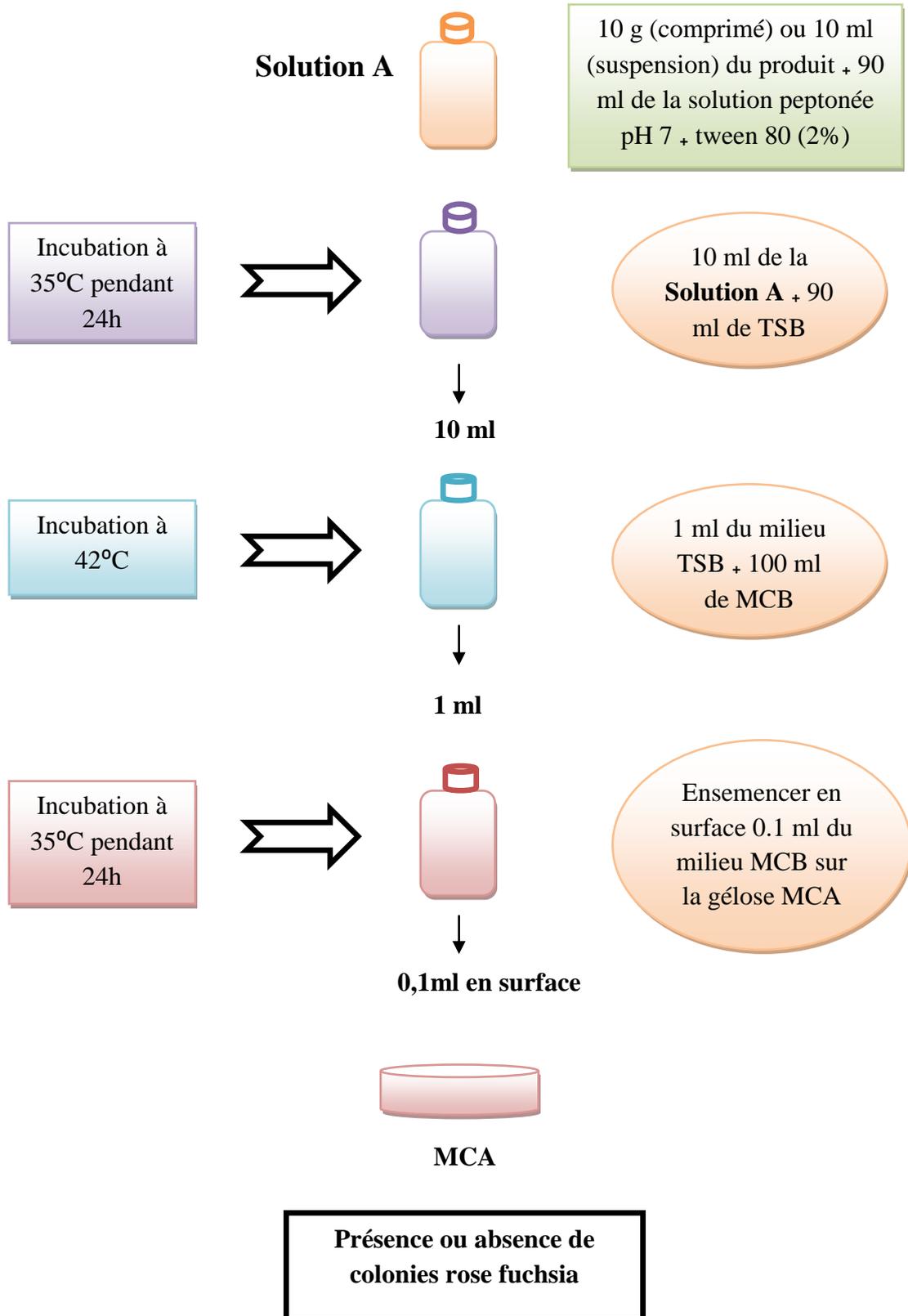
La validation de la méthode de dénombrement sur plaque consiste à la contamination, avec des souches de références recommandées par la Pharmacopée Européenne, des témoins et essais avec un inoculum qui correspond à nombre de colonies inférieur ou égal à 100 UFC/ml.

La préparation des suspensions mères s'effectue de la même manière que celle réalisée pour le test de fertilité.

#### II.2.6.2. Préparation des dilutions des souches de référence pour l'obtention du volume à inoculer

Cette étape est indispensable pour réaliser la validation de la méthode d'analyse microbiologique, et ceci en déterminant un inoculum dont le nombre de colonies sera inférieur ou égale à 100 UFC/ml, la Pharmacopée Européenne préconise l'utilisation de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH7 (diluant). On prélève ainsi 1 ml de la suspension mère enrichie de TSB que l'on transpose dans 9 ml du diluant pour obtenir les dilutions décimales.

Au moins 3 tests ont été réalisés pour chaque souche bactérienne et fongique.



**Figure 6:** Schéma des étapes de la recherche d'*E.coli* pour les produits **Nebcar®** et **Abilizole®** par la méthode de dénombrement sur plaque de gélose (**Originale, 2018**)

➤ **Souches bactériennes**

Prélever aseptiquement 1 ml des dilutions  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$  à l'aide d'une pipette graduée stérile et ensemer en profondeur chaque inoculum prélevé dans une boîte de pétri. Couler 20 ml de la gélose TSA fondue et maintenue en surfusion à 45 °C, bien homogénéiser les boîtes des mouvements de huit puis les incuber à 33-35°C pendant 24h. Le dénombrement des colonies apparues se fait à l'aide d'un compteur de colonies.

➤ **Souches fongiques**

Prélever 1 ml des dilutions  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  de *Candida albicans* et  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$  pour *Aspergillus niger* et ensemer en profondeur chaque inoculum dans des boîtes Pétri qui sont coulées par la suite de la gélose SDA fondue et maintenue en surfusion à 45°C, Après une bonne homogénéisation par des mouvements de huit et on incube les boîtes à 23-25°C pendant 48h. Un compteur de colonies permet la lecture des boîtes.

### II.2.6.3. Détermination du volume à inoculer

Le comptage des colonies apparues après un temps donné d'incubation est effectué à l'aide d'un compteur des colonies et suivi de la déduction du volume à inoculer, le volume de l'inoculum ne doit pas dépasser 1% du volume total. On peut prélever ce dernier à partir de la solution mère. (USP, 2018)

### II.2.6.4. Dénombrement des germes aérobies viables totaux en présence et en absence des produits finis Nebcar<sup>®</sup> et Abilizole<sup>®</sup>

Peser 10 g des comprimés de Nebcar<sup>®</sup> ou mesurer 10 ml d'Abilizole<sup>®</sup> dans un flacon gradué stérile et ajuster jusqu'à 100 ml avec la solution tampon peptonée pH7 contenant Tween 80 à 2% (dilution décimale 1/10) (solution A).

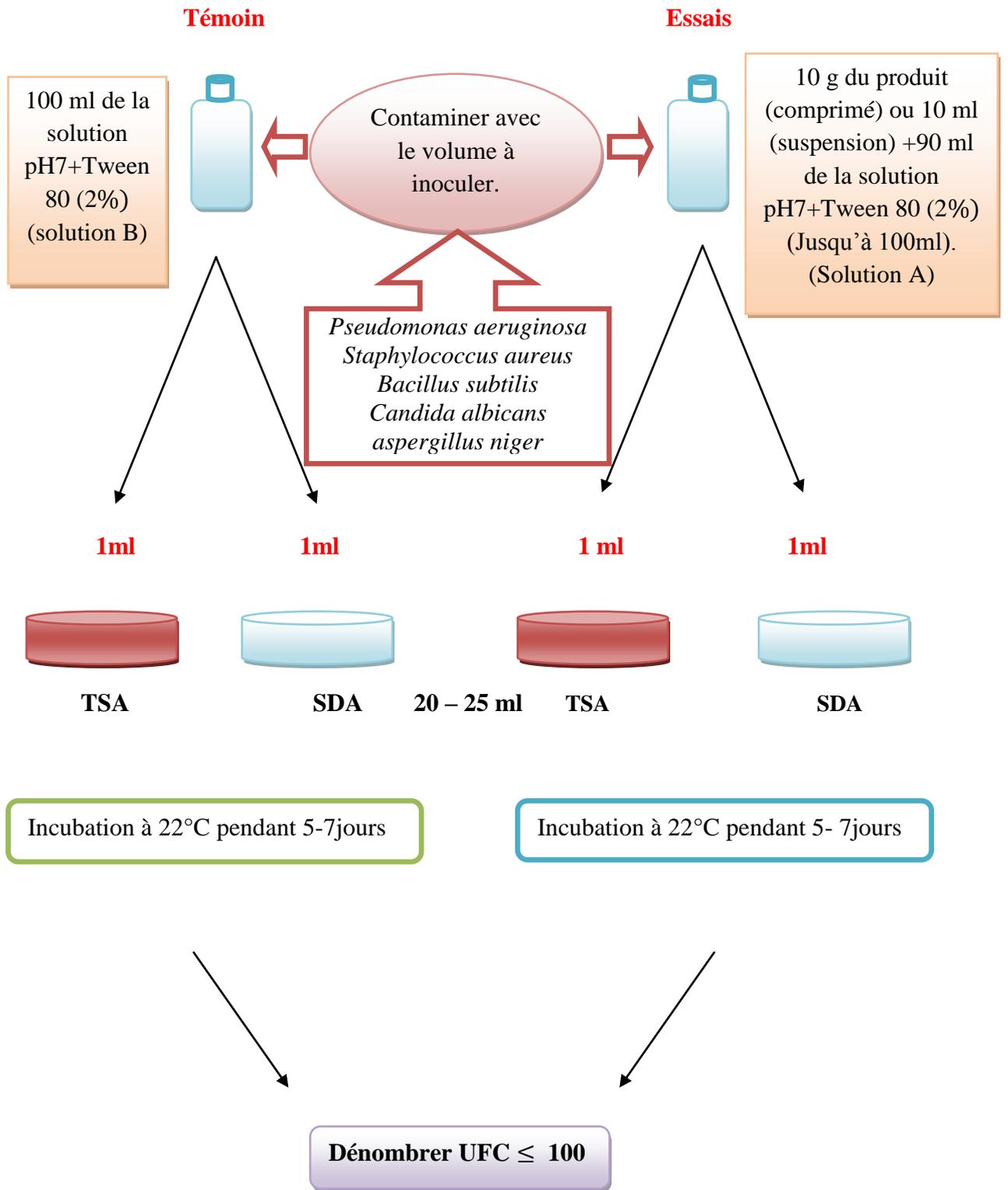
Après dissolution et homogénéisation contaminer avec le volume à inoculer précédemment déterminé.

Préparer les témoins en contaminant 100 ml de chaque diluant pH7 avec le volume à inoculer (solution B) pour chaque souche :

*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, ensemer en profondeur 1 ml de chaque préparation.

Verser dans chaque boîte de pétri 25 ml du milieu gélosé TSA pour le dénombrement des souches bactériennes et 25 ml de SDA pour les souches fongiques.

Incuber les boîtes de TSA à 33°C pendant 3-5 jours et à 23°C les boîtes de SDA pendant 5-7 jours. La lecture des colonies observées se fait à l'aide d'un compteur de colonies (**Figure 7**).



**Figure 7** : Schéma représentant le protocole de la validation de la méthode de dénombrement des germes aérobies viables totaux pour les produits **Abilizole®** et **Nebcar®** (Originale, 2018)

Enfin on calcule le facteur F en divisant le nombre de colonies trouvées dans l'essai sur le nombre moyen des colonies du témoin.

Selon la pharmacopée européenne le facteur calculé F doit être  $\leq 2$ . Par conséquent si le nombre d'UFC des essais dépassent plus de 2 fois celui des témoins le test est à refaire. Les UFC obtenues dans l'essai doivent représenter 70% de celles obtenues dans le témoin (**USP, 2018**).

Les mêmes étapes sont entreprises pour les dilutions (1/50 et 1/100) des produits.

#### II.2.6.5. Validation de la recherche des germes spécifiques

*Escherichia coli* est le seul germe spécifique recommandé par la pharmacopée européenne, pour les produits finis Nebcar<sup>®</sup> et Abilizole<sup>®</sup>. Pour valider la recherche de ce germe on procède comme suit :

Peser 10 g des comprimés ou mesurer 10 ml d'Abilizole<sup>®</sup> dans un flacon gradué stérile et ajuster jusqu'à 100 ml avec la solution tampon peptonée pH7 contenant 2% de Tween80 afin de permettre la dissolution puis homogénéiser (solution A).

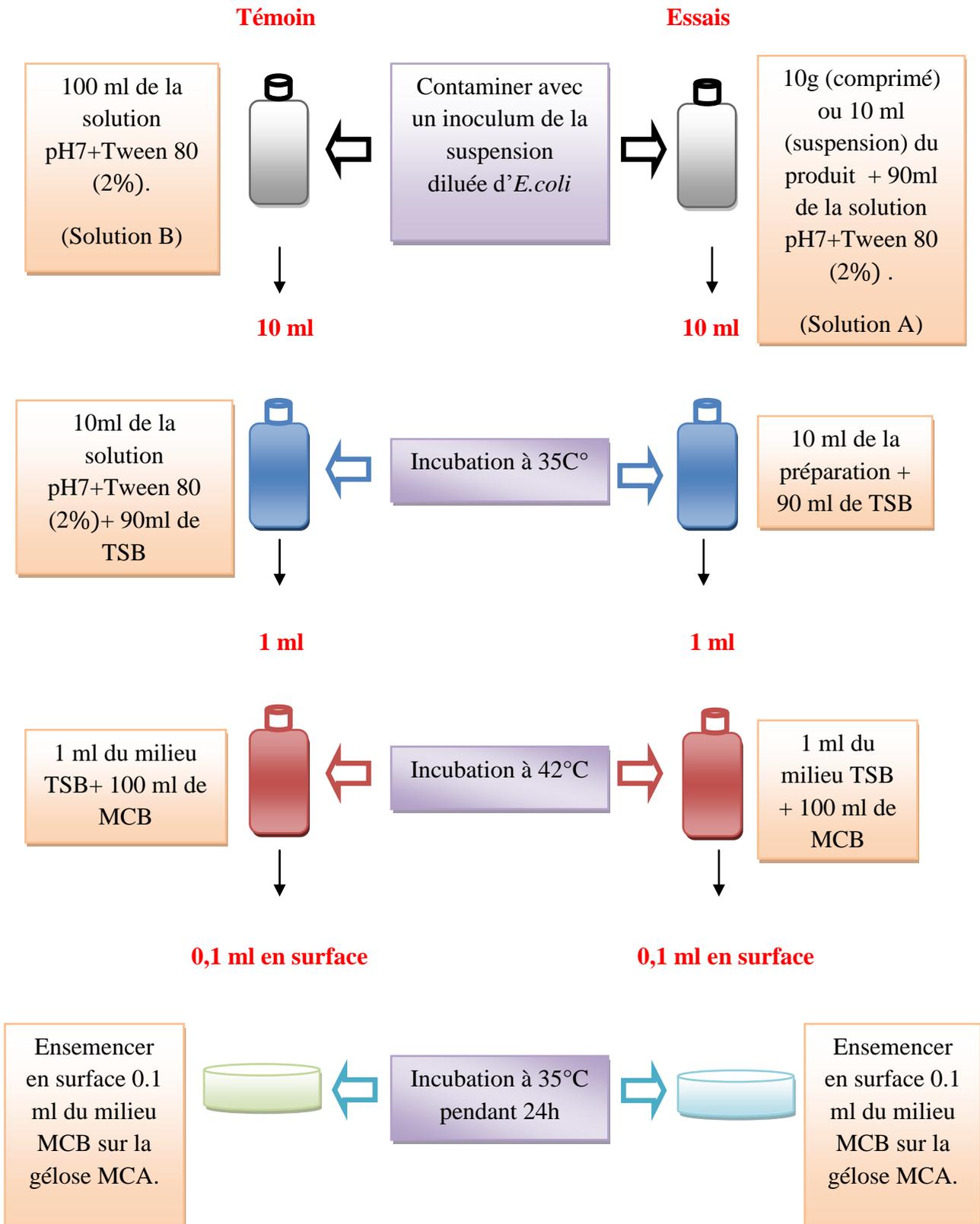
Contaminer avec un inoculum de la suspension diluée d'*E.coli*. Prélever ensuite 10 ml de cette solution et l'ensemencer dans 90 ml de TSB. Incuber les flacons à 35°C pendant 24h.

A l'aide d'une pipette stérile, prélever 1 ml du bouillon TSB pré-enrichi et l'ensemencer dans 100 ml de MCB. Incuber à 42°C pendant 24h.

Au terme de l'incubation, ensemencer en surface 0,1 ml du milieu d'enrichissement sélectif MCB sur une boîte de pétri contenant le milieu gélosé MCA et l'incuber pendant 18-24h à 35°C. Observer la présence des colonies roses fushia (**Figure 8**).

Les mêmes étapes sont entreprises pour les dilutions (1/50 et 1/100) des produits.

NB : en parallèle, les mêmes étapes sont effectuées en absence du produit représentant le témoin (solution B). A partir du témoin ensemencer 1 ml en profondeur, couler 25 ml de TSA le premier jour et incuber à 33-35°C pendant 24h. Faire la lecture pour se rassurer de la présence microbienne.



**Figure 8 :** Schéma de la validation de la recherche d'*E.coli* pour les produits Nebcar® et Abilizole® par la méthode de dénombrement sur plaque de gélose (Originale, 2018)

**RESULTATS**

**ET**

**DISCUSSION**

### III. Résultats et discussion

#### III.1. Résultats du test de stérilité des milieux de culture

La vérification de la stérilité permet de vérifier la qualité des milieux de cultures avant d'entamer tout contrôle microbiologique. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 5** et la **figure 9**:

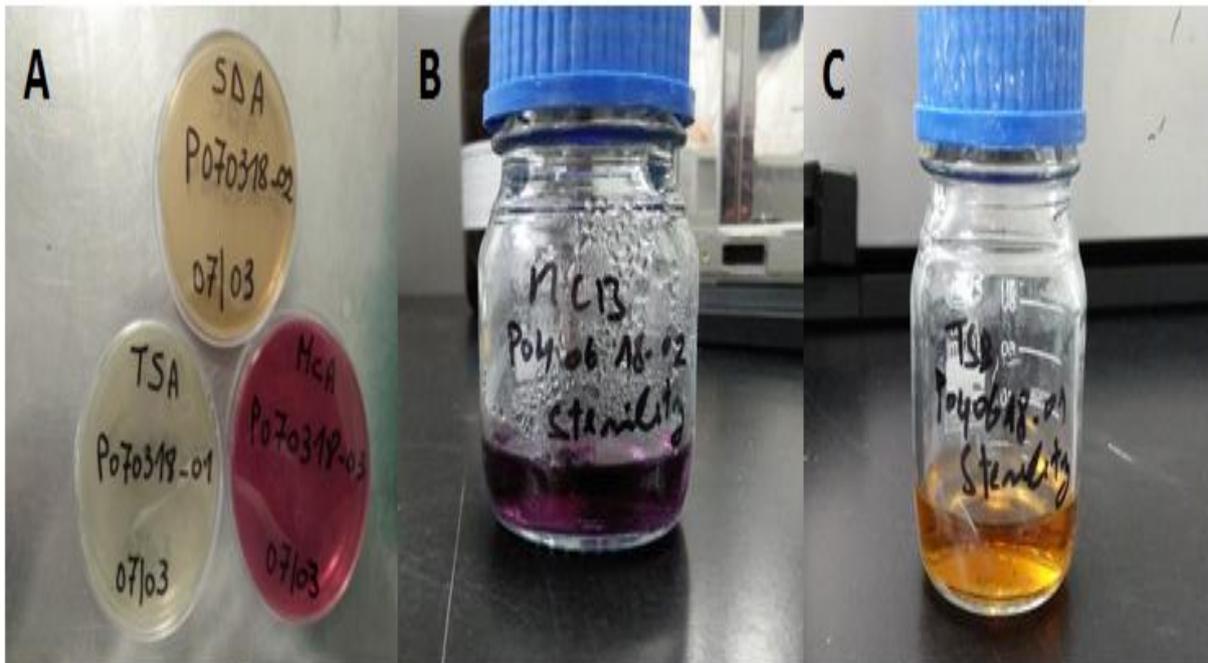
**Tableau 5** : Résultats du test de stérilité des milieux de culture solides et liquides

Milieu de culture	Type du milieu	Condition d'incubation	Observation
<b>TSA</b>	Solide	35°C pendant 5 jours	Absence de toute croissance microbienne
<b>SDA</b>	Solide	22°C pendant 5 jours	
<b>MCA</b>	Solide (sélectifs)	35°C pendant 5 jours	
<b>TSB</b>	Bouillon d'enrichissement	35°C pendant 5 jours	Les milieux restent limpides
<b>MCB</b>	Bouillon d'enrichissement (sélectif)	42°C pendant 5 jours	

Le tableau montre une absence totale de toute prolifération microbienne dans les milieux liquides et solides, ce qui confirme leur stérilité et leur adéquation pour la réalisation des différents contrôles microbiologiques.

#### III.2. Résultats du test de fertilité

Afin de tester la fertilité des différents milieux, ces derniers sont contaminés par un volume déterminé de suspension bactérienne ( $\leq 100\text{UFC/ml}$ ) issus des souches de référence puis à les incuber à des températures optimales pendant 24h ou 48h . Ce test permet de contrôler et prouver la performance des milieux de culture solides et liquides et de vérifier leurs propriétés nutritives et sélectives.



**Figure 9** : Résultats du test de stérilité. (A) Stérilité des milieux SDA, TSA et MCA, (B) Stérilité du milieu MCB et (C) Stérilité du milieu TSB (Originale, 2018)

### III.2.1 Résultats du test de fertilité des milieux de culture gélosés ordinaires

Les milieux solides utilisés sont ensemencés par des souches bien déterminées selon les recommandations de la pharmacopée. Ces milieux sont incubés dans des conditions spécifiées et les résultats sont présentés dans le **tableau 6** :

**Tableau 6** : Résultats du test de fertilité des milieux de culture gélosés ordinaires

Milieux de culture	Souches	Standards UFC/ml	UFC/ml calculées	Facteur $F \leq 2$
<b>TSA</b>	<i>P.aeruginosa</i>	97	95	0,98
	<i>S.aureus</i>	101	53	0,52
	<i>B.subtilis</i>	101	63	0,62
	<i>C.albicans</i>	106	75	0,70
	<i>A.niger</i>	90	75	0,83
<b>SDA</b>	<i>C.albicans</i>	106	80	0,75
	<i>A.niger</i>	100	85	0,85

Les résultats représentant le nombre de colonies calculées après incubation des boîtes (24h à 35°C pour le milieu TSA et 48h pour le SDA) comparées aux standards. Ces derniers variant entre 90 et 106 sont obtenus après plusieurs essais au laboratoire de microbiologie d'El KENDI.

Un milieu est considéré comme fertile si le facteur F est compris dans l'intervalle  $F \leq 2$ . Ce facteur est calculé par la formule suivante :  $F = \text{UFC calculées} / \text{UFC standardisées}$

D'après les résultats obtenus, le facteur F calculé pour chaque souche dans les deux milieux varie entre 0,52 et 0,98. Ces deux milieux testés sont donc favorables pour la croissance microbienne.

### III.2.2. Résultats du test de fertilité d'un milieu de culture général liquide

Après avoir ensemencé le bouillon d'enrichissement TSB avec un inoculum  $\leq 100$  UFC/ml et incubé dans les conditions optimales, ce dernier devient trouble montrant une multiplication des germes (**Tableau 7**). Ceci révèle que ce bouillon fournit les conditions favorables à la croissance microbienne.

**Tableau 7:** Récapitulation des résultats du test de fertilité du bouillon (TSB)

Bouillon	Souches	Conditions d'incubation	Résultats
<b>TSB</b>	<i>P.aeruginosa</i>	35°C pendant 24h	Apparition de trouble
	<i>S.aureus</i>		
	<i>B.subtilis</i>		
	<i>C.albicans</i>	22°C pendant 24h	Apparition de trouble
	<i>A.niger</i>		

### III.2.3. Résultats du test de fertilité des milieux sélectifs, solide (MCA) et liquide (MCB)

Le bouillon d'enrichissement liquide et le milieu gélosé MCA sont des milieux de culture sélectifs qui permettent la croissance d'*E.coli*. Les résultats du test de fertilité sont représentés dans le **tableau 8** :

**Tableau 8 :** Résultats du test de fertilité du milieu gélosé MCA et du bouillon d'enrichissement MCB

Milieu	Souche	Conditions d'incubation	Résultats
<b>MCB</b>	<i>E.coli</i>	42°C pendant 24h	Présence de trouble
<b>MCA</b>	<i>E.coli</i>	35°C pendant 24h	Présence d' <i>E.coli</i>

Après ensemencement du bouillon par un inoculum  $\leq 100\text{UFC/ml}$ , le milieu est devenu trouble après 24h d'incubation à 42°C, avec un virage de sa couleur au violet jaunâtre, ceci est dû à l'acidification du milieu suite à la dégradation du lactose présent dans ce bouillon par *E.coli*.

La gélose MCA inoculée et incubée à des conditions optimales a permis une croissance des colonies roses fushia caractéristiques d'*E.coli* ce qui confirme la fertilité et la sélectivité de ce milieu.

Les résultats des tests de stérilité et de fertilité sont conformes aux normes imposées par la pharmacopée ainsi les milieux de culture peuvent être utilisés pour l'analyse microbiologique et la validation de la méthode d'analyse des produits pharmaceutiques.

### III.3. Résultats du contrôle microbiologique de l'eau

La détermination de la qualité microbiologique de l'eau purifiée a démontré que cette dernière était conforme aux normes préconisées par la pharmacopée (**USP, 2018**) et cela aux différents points testés (**Tableau 9 et Figure 10**).

**Tableau 9** : Résultats du contrôle microbiologique de l'eau purifiée

Germes	Résultats UFC/ml	Normes UFC/ml (USP, 2017)	Conformité
<b>Germes aérobies</b>			
<b>viables totaux</b>	1-3	<100	Conforme

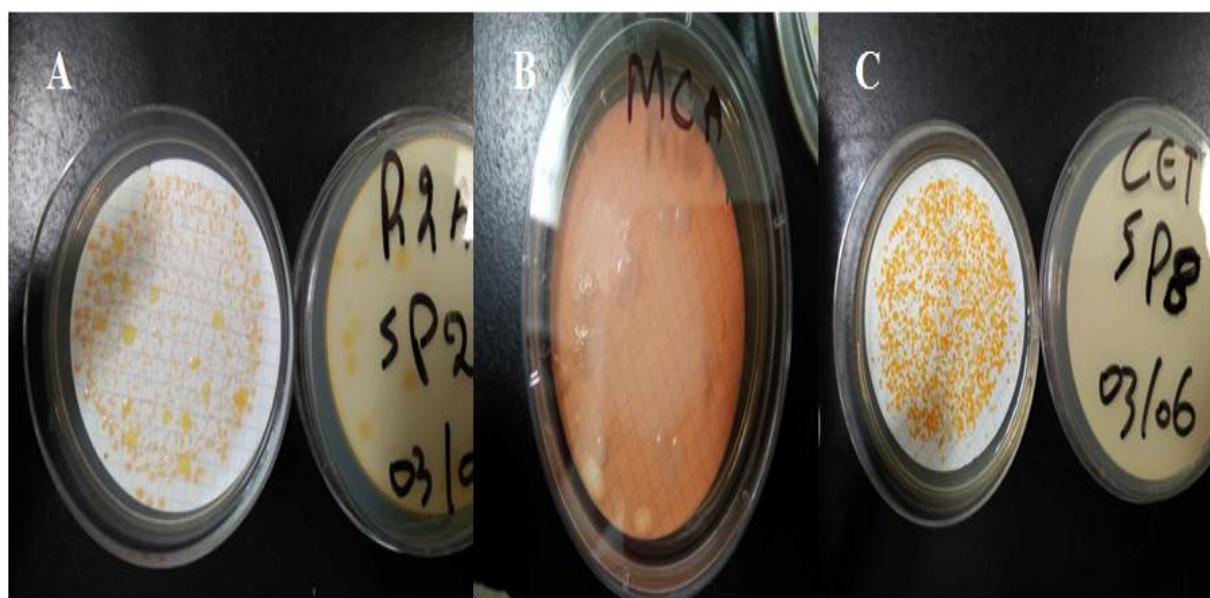
De même que l'eau purifiée, la qualité microbiologique de l'eau potable a démontré que cette dernière était conforme aux normes préconisées par les pharmacopées aux différents points testés. En effet, une absence de coliformes totaux et de *Pseudomonas* a été marquée ainsi qu'un taux de germes aérobies viables totaux conforme aux normes (**Tableau 10 et Figure 11**)

**Tableau 10** : Résultats du contrôle microbiologique de l'eau potable

Germes	Résultats UFC/ml	Normes UFC/ml (USP, 2017)	Conformité
<b>Germes aérobies</b>			
<b>viables totaux</b>	2-4	< 500	Conforme
<b>Coliformes totaux</b>	Absence	Absence	Conforme
<i>Pseudomonas</i>	Absence	Absence	Conforme



**Figure 10** : Résultats du contrôle microbiologique de l'eau purifiée (Originale, 2018)



**Figure 11** : Résultats du contrôle microbiologique de l'eau potable. (A) dénombrement de la flore aérobie totale, (B) recherche des coliformes totaux et (C) recherche de *Pseudomonas* (Originale, 2018)

### III.4. Résultats du contrôle microbiologique de l'environnement

#### III.4.1. Résultats du contrôle microbiologique de l'air

L'analyse microbiologique de l'air a révélé que ce dernier est conforme aux normes préconisées par la pharmacopée (**USP, 2018**) et cela au niveau des différents points testés au niveau de l'unité de production (**Tableau 11 et Figure 12**).

**Tableau 11** : Résultats du contrôle microbiologique de l'air

Classes	Résultats UFC/4 heures	Les normes UFC/4heures	Conformité
<b>A</b>	< 1	< 1	Conforme
<b>C</b>	5-15	< 50	Conforme
<b>D</b>	5-70	< 100	Conforme

**Classe B** : qui forme une enceinte autour de la **classe A** dans laquelle pas plus d'une colonie est acceptée (hotte par exemple), caractérise le local dans lequel s'effectue le remplissage d'un produit injectable (**BPF, 2008**).

**Classes C et D** : ou se font les opérations les moins critiques en garde de l'asepsie, comme la préparation des solutions et celle du matériel de production. (**BPF, 2008**).

#### III.4.2. Résultats du contrôle microbiologique des surfaces

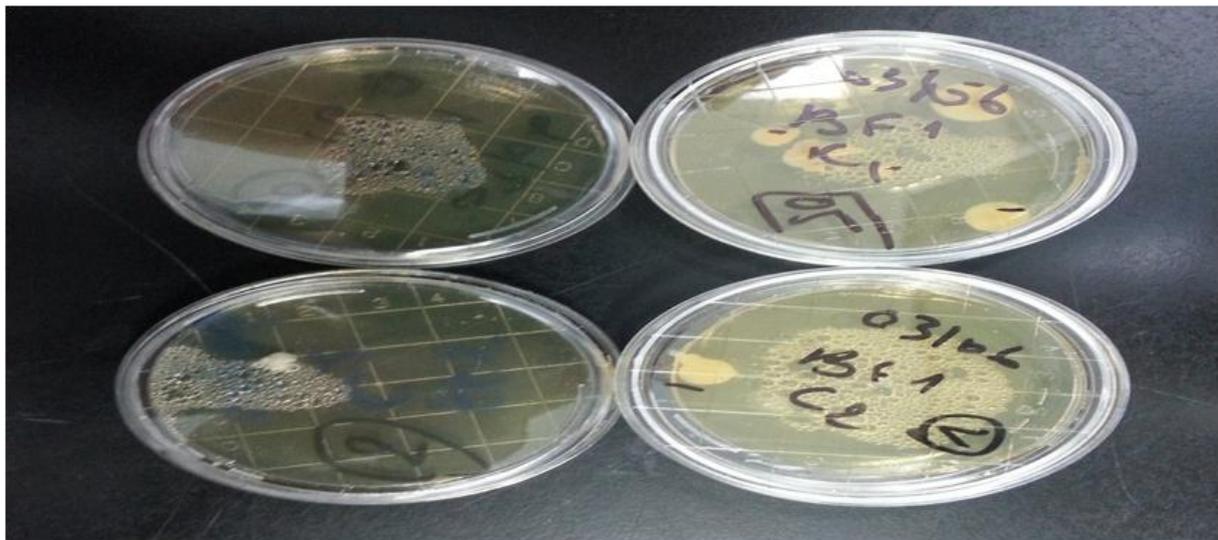
De même que l'air, la détermination de la qualité microbiologique des surfaces a démontré qu'elles sont conformes aux normes préconisées par la pharmacopée (**USP, 2018**) et cela au niveau des différents points testés (**Tableau 12 et Figure 13**).

**Tableau 12** : Résultats du contrôle microbiologique des surfaces

Classes	Résultats UFC/plaque	Les normes UFC/plaque	Conformité
<b>A</b>	< 1	< 1	Conforme
<b>C</b>	0-7	< 25	Conforme
<b>D</b>	0-12	< 50	Conforme



**Figure 12 :** Résultats du contrôle microbiologique de l'air dans (A) le milieu SDA et (B) le milieu TSA (Originale, 2018)



**Figure 13 :** Résultats du contrôle microbiologique des surfaces (Originale, 2018)

Les résultats du contrôle de la qualité microbiologique de l'environnement confirment les conditions de stérilité au niveau des locaux de production ce qui assure la génération des médicaments de qualité.

### III.5. Résultats de l'analyse microbiologique des produits pharmaceutiques non obligatoirement stériles (Nebcar<sup>®</sup> et Abilizole<sup>®</sup>)

#### III.5.1. Résultats du dénombrement des germes aérobies viables totaux en absence et en présence du produit

L'analyse microbiologique a été réalisée à différentes dilutions 1/10, 1/50 et 1/100 sur les produits pharmaceutiques non obligatoirement stériles : comprimé Nebcar<sup>®</sup> et suspension Abilizole<sup>®</sup>, en attendant que la méthode d'analyse soit validée. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 13** et la **Figure 14** :

**Tableau 13** : Résultats du dénombrement des germes aérobies viables totaux.

Germes	Témoin	Résultats		
		UFC/1g ou 1ml des produits	Normes UFC/g ou ml	Conformité
Germes aérobies viables totaux	00	< 10	< 10 <sup>3</sup>	Conforme
Levure et moisissures	00	< 10	< 10 <sup>2</sup>	Conforme

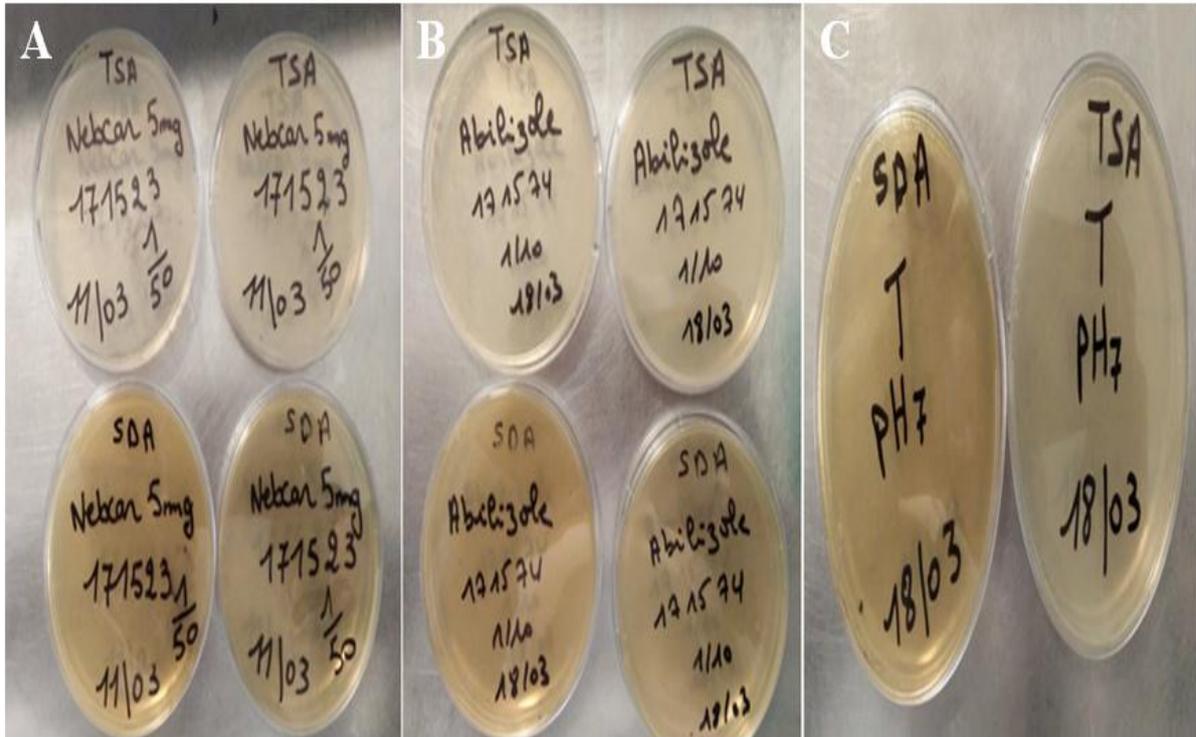
Les résultats du contrôle témoin (en absence du produit) montrent l'absence totale des colonies dans les deux milieux TSA et SDA, cela confirme que le test a été effectué dans des conditions de stérilité et que les milieux utilisés (pH7, TSA, SDA) étaient bien stériles.

Pour les échantillons, nous constatons une absence totale de germes aérobies viables totaux ainsi que des levures et moisissures pour les différentes dilutions des produits. Le résultat est exprimé comme  $\leq 10$  UFC par gramme ou ml des produits.

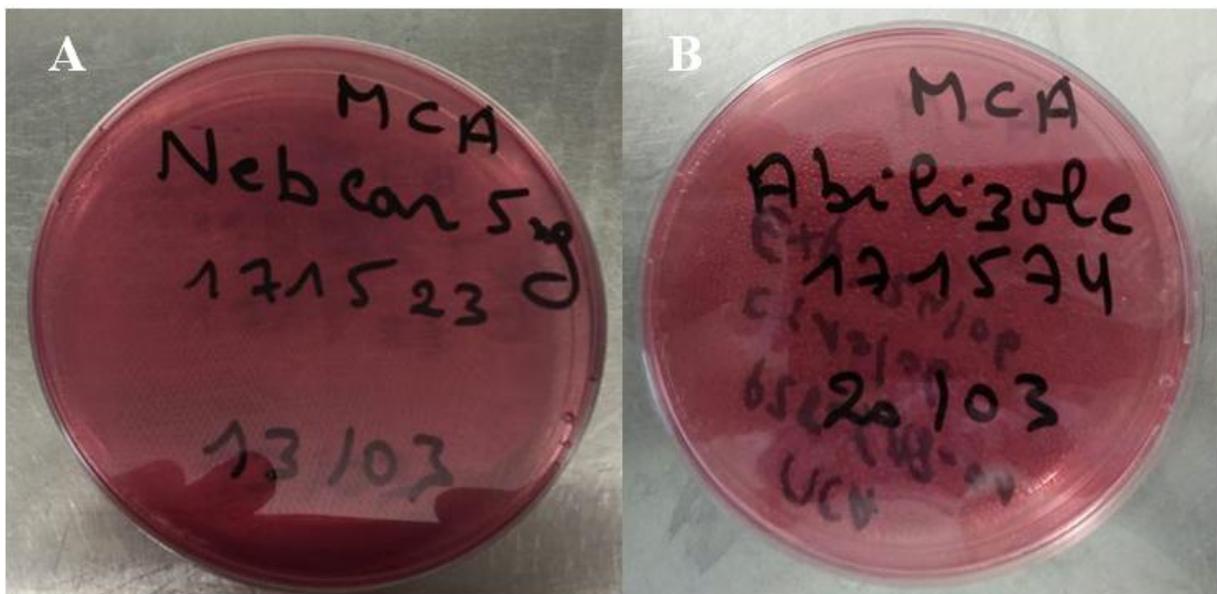
Les résultats obtenus sont conformes aux normes préconisées de la pharmacopée américaine 2018. Cela témoigne la qualité de médicaments ainsi que celle des matières premières, la qualification du personnel et le respect des Bonnes Pratiques de Fabrication.

### III.5.2. Résultats de la recherche des germes spécifiques (*E.coli*)

La lecture des boites MCA après incubation à 35°C pendant 24h montre qu'aucune colonie rose fushia n'est apparue. Cela signifie l'absence totale d'*E.coli* dans un gramme du produit Nebcar<sup>®</sup> ou 1 ml du produit Ablizole<sup>®</sup> attestant ainsi la qualité, la sécurité et l'innocuité de la préparation. L'absence de ce germe reflète le respect des Bonnes Pratiques d'hygiène (pas de contamination fécale) (**Figure 15**).



**Figure 14 :** Résultats du dénombrement des germes aérobies viables totaux en absence et en présence du produit. (A) le produit Nebcar<sup>®</sup>, (B) le produit Abilizole<sup>®</sup> et (C) le témoin (Originale, 2018)



**Figure 15 :** Résultats du dénombrement des germes spécifiques (*E.coli*) (A) le produit Nebcar<sup>®</sup> et (B) le produit Abilizole<sup>®</sup> (Originale, 2018)

### **III.6. Résultats de la validation de la méthode de dénombrement des GAVT et GLMT pour les produits non obligatoirement stériles**

Dans le but de valider la méthode utilisée dans le contrôle microbiologique des deux produits analysés, nous avons réalisé au moins trois essais en absence et en présence du produit.

#### **III.6.1. Résultats de la détermination du volume à inoculer pour le produit Nebcar<sup>®</sup> 5mg**

Dans un premier temps, une série de dilutions de 1/10 des souches de références a été réalisée ainsi la charge microbienne de chaque dilution a été mesurée (**Annexe 5**). Ensuite, afin de déterminer l'inoculum, un volume est prélevé à partir de la dilution qui correspond à la charge microbienne inférieure ou égale à 100 UFC/ml (colorée en rouge) (**Annexe 5**), (**Tableaux 14**) et (**Figure 16**).

**Tableau 14** : Récapitulation des résultats de la détermination des volumes à inoculer.

Souches	Tests	UFC calculées/ ml de dilution	Dilutions à prélever	Volumes à inoculer
<i>P.aeruginosa</i>	Test 1	90 / 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	0,11ml
	Test 2	18 / 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	0,55 ml
	Test 3	80 / 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	0,12ml
<i>S.aureus</i>	Test 1	91 / 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	0,10 ml
	Test 2	60 / 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	0,16ml
	Test 3	66 / 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	0,15 ml
<i>B.subtilis</i>	Test 1	188 / 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	0,53ml
	Test 2	216 / 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	0,46 ml
	Test 3	242 / 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	0,41 ml
<i>C.albicans</i>	Test 1	107 / 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	0,93ml
	Test 2	98 / 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	1ml
	Test 3	222 / 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	0,45ml
<i>A.niger</i>	Test 1	252 / 10 <sup>-2</sup>	Solution mère	0,39ml
	Test 2	112 / 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	0,89ml
	Test 3	80 / 10 <sup>-3</sup>	Solution mère	0,12ml
<i>E.coli</i>	Test 1	57 / 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	0,17ml
	Test 2	60 / 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-3</sup>	0,16ml
	Test 3	14 / 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	0,71ml

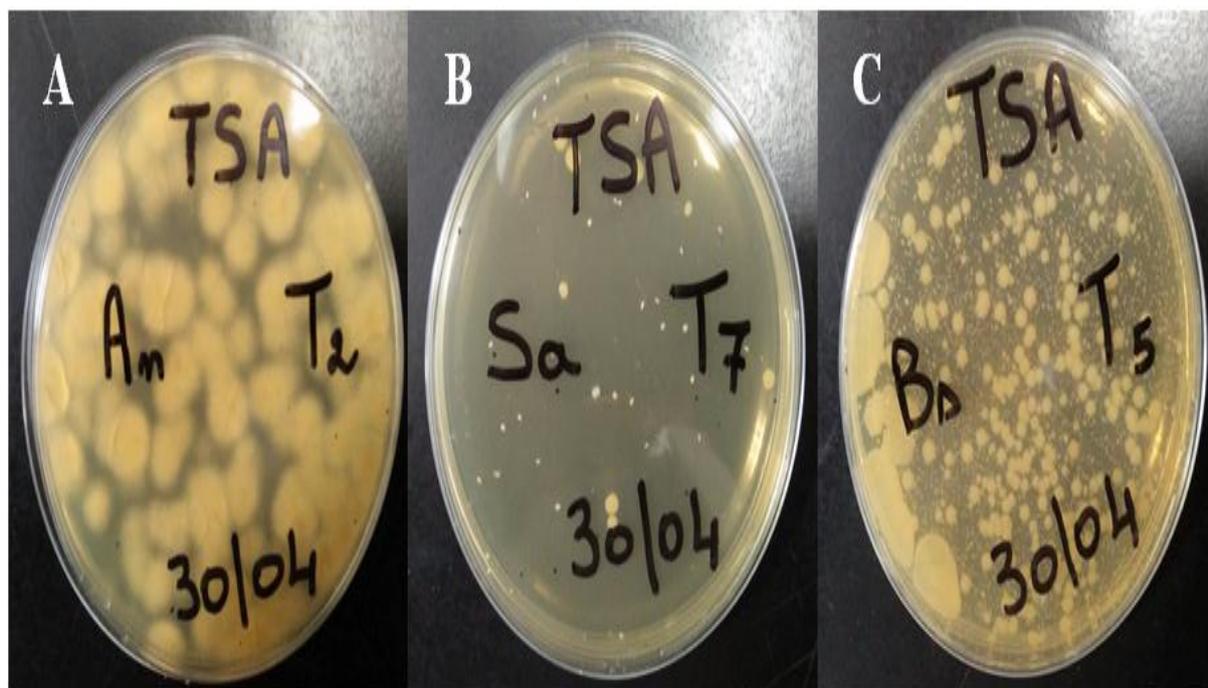
Les volumes ainsi calculés seront prélevés de la dilution sélectionnée et inoculés dans les flacons d'essais et du témoin afin de valider la méthode utilisée pour la détection des différentes souches.

### III.6.2. Résultats de la détermination de l'inoculum pour l'Abilizole® 1mg/ml

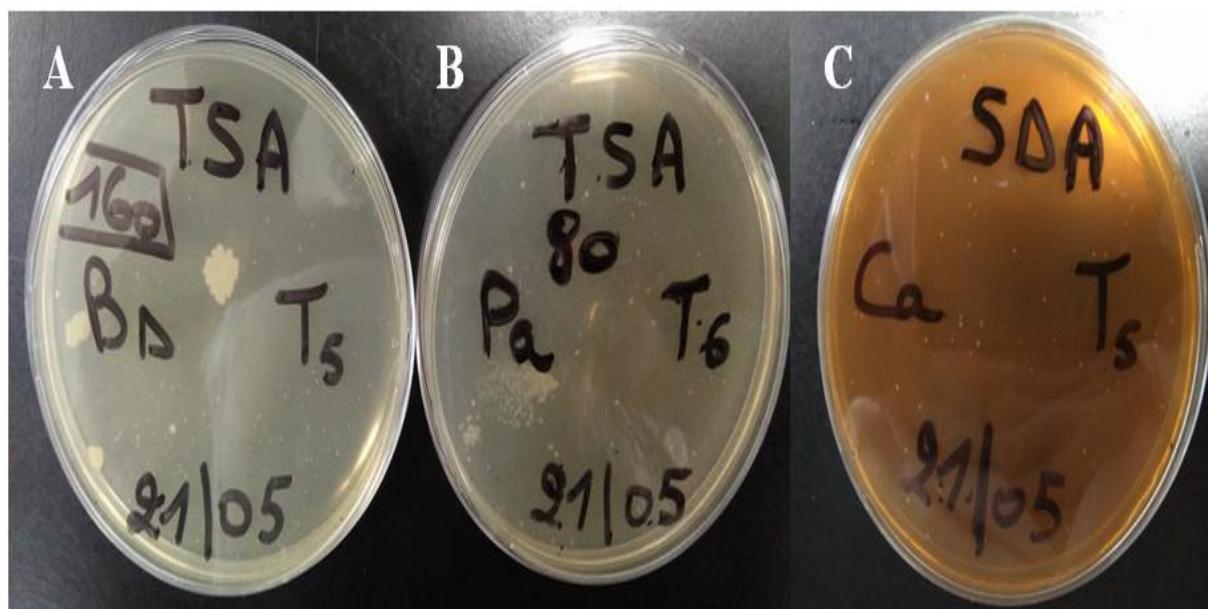
De la même manière que pour le produit Nebcar®, une série de dilutions de 1/10 des souches de références a été réalisée ainsi la charge microbienne de chaque dilution a été mesurée (**Annexe 6**). Ensuite, afin de déterminer l'inoculum, un volume est prélevé à partir de la dilution qui correspond à la charge microbienne inférieure ou égale à 100 UFC/ml (colorée en rouge) (**Annexe 6**), (**Tableaux 15**) et (**Figure 17**).

**Tableau 15** : Récapitulation des résultats de la détermination de l'inoculum.

Souches	Tests	UFC calculées/ ml de dilution	Dilutions à prélever	Volumes à inoculer
<i>P.aeruginosa</i>	Test 1	72 / 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	0,13 ml
	Test 2	80 / 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-3</sup>	0,12 ml
	Test 3	145 / 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-4</sup>	0,68 ml
<i>S. aureus</i>	Test 1	72 / 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	0,13 ml
	Test 2	75 / 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	0,13ml
	Test 3	53 / 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	0,18ml
<i>B.subtilis</i>	Test 1	160 / 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	0,62 ml
	Test 2	216 / 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	0,46ml
	Test 3	242 / 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	0,41ml
<i>C.albicans</i>	Test 1	60/ 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-2</sup>	0,16 ml
	Test 2	80/10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-2</sup>	0,12ml
	Test 3	156 / 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	0,64ml
<i>A.niger</i>	Test 1	64 / 10 <sup>-3</sup>	Solution mère	0,15ml
	Test 2	66 / 10 <sup>-3</sup>	Solution mère	0,15ml
	Test 3	195 / 10 <sup>-2</sup>	Solution mère	0,51ml
<i>E.coli</i>	Test 1	60 / 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-3</sup>	0,16ml
	Test 2	82 / 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	0,12ml
	Test 3	47 / 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	0,21ml



**Figure 16** : Détermination de la charge microbienne (Nebcar<sup>®</sup>) (A) *Aspergillus niger*, (B) *Staphylococcus aureus* et (C) *Bacillus subtilis* (Originale, 2018)



**Figure 17** : Détermination de la charge microbienne (Abilizole<sup>®</sup>) (A) *Bacillus subtilis*, (B) *Pseudomonas aeruginosa* et (C) *Candida albicans* (Originale, 2018)

De même que précédemment, les volumes ainsi calculés seront prélevés de la dilution sélectionnée et inoculés dans les flacons d'essais et du témoin afin de valider la méthode utilisée pour la détection des différentes souches.

### III.6.3. Résultats de la validation de la méthode de dénombrement des germes aérobies viables totaux

La validation de la méthode de dénombrement des germes aérobies viables totaux sur milieu gélosé est effectuée suite à la détermination du volume à inoculer pour les différentes souches qui font l'objet de cette technique pour les deux produits Nebcar<sup>®</sup> et Abilizole<sup>®</sup>.

Les préparations des produits dilués à 1/10, 1/50 ou 1/100 ainsi que les témoins ont été inoculés avec les volumes calculés précédemment, par conséquent la concentration des souches de référence est d'environ 100 UFC/ml.

Les tableaux (16, 17, 18 et 19) représentent les différents résultats de la validation pour les germes aérobies totaux ainsi que les levures et moisissures.

A noter que les résultats des dilutions des produits non présentés dans les tableaux correspondent à des résultats négatifs ou une absence de la croissance microbienne a été marquée.

Les résultats de la validation du dénombrement des GAVT et GLMT pour le produit Nebcar<sup>®</sup> montre que les souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* sont détectables à la dilution 1/50 du produit alors que les souches *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* sont détectables dans les dilutions 1/10 et 1/50. Tandis qu'*Aspergillus niger* est détectable à la dilution 1/50 (Tableau 16 et 17) et (Figure 18)

**Tableau 16** : Récapitulation des résultats de la validation du dénombrement des germes aérobies viables totaux pour le produit Nebcar<sup>®</sup>.

<i>Staphylococcus aureus</i>				
Témoins UFC/ml	Essais UFC/ml		Facteur F 1/10	Facteur F 1/50
	1/10*	1/50*		
81 ± 15	70 ± 5	49 ± 5	0,87 ± 0,16	0,61 ± 0,06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
Témoins UFC /ml	Essais UFC/ml		Facteur F	
	1/50*			
80 ± 18	78 ± 17		0,96 ± 0,29	
<i>Bacillus subtilis</i>				
Témoins UFC /ml	Essais UFC/ml		Facteur F	
	1/50*			
61 ± 9	86 ± 3		1,43 ± 0,28	

\* dilution du produit

**Tableau 17** : Récapitulation des résultats obtenus pour le dénombrement des levures et moisissures pour le produit Nebcar<sup>®</sup>

<i>Candida albicans</i>							
Témoins UFC /ml		Essais UFC/ml			Facteur F 1/10	Facteur F 1/50	
		1/10*	1/50*				
TSA	SDA	SDA	TSA	SDA	SDA	TSA	SDA
43 ± 8	53 ± 10	45 ± 5	45 ± 7	53 ± 10	0,94 ± 0,14	0,96 ± 0,09	1,1 ± 0,11
<i>Aspergillus niger</i>							
Témoins UFC /ml		Essais UFC/ml		Facteur F			
		1/50*					
TSA	SDA	TSA	SDA	TSA	SDA		
72 ± 17	50 ± 20	84 ± 19	59 ± 19	1,15 ± 0,27	1,28 ± 0,32		

\* dilution du produit

Les résultats de la validation du dénombrement des GAVT et GLMT pour le produit Abilizole<sup>®</sup> montre que toutes les souches sont détectables dans la dilution 1/10 du produit (Tableau 18 et 19) et (Figure 19)

**Tableau 18** : Récapitulation des résultats obtenus pour le dénombrement des germes aérobies viables totaux pour le produit Abilizole®.

Souches	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>Témoins UFC /ml</b>	72 ± 11	68 ± 7	57 ± 11
<b>Essais UFC/ml 1/10*</b>	58 ± 23	46 ± 13	69 ± 11
<b>Facteur F 1/10*</b>	0,77 ± 0,20	0,67 ± 0,19	1,19 ± 0,06

\* dilution du produit

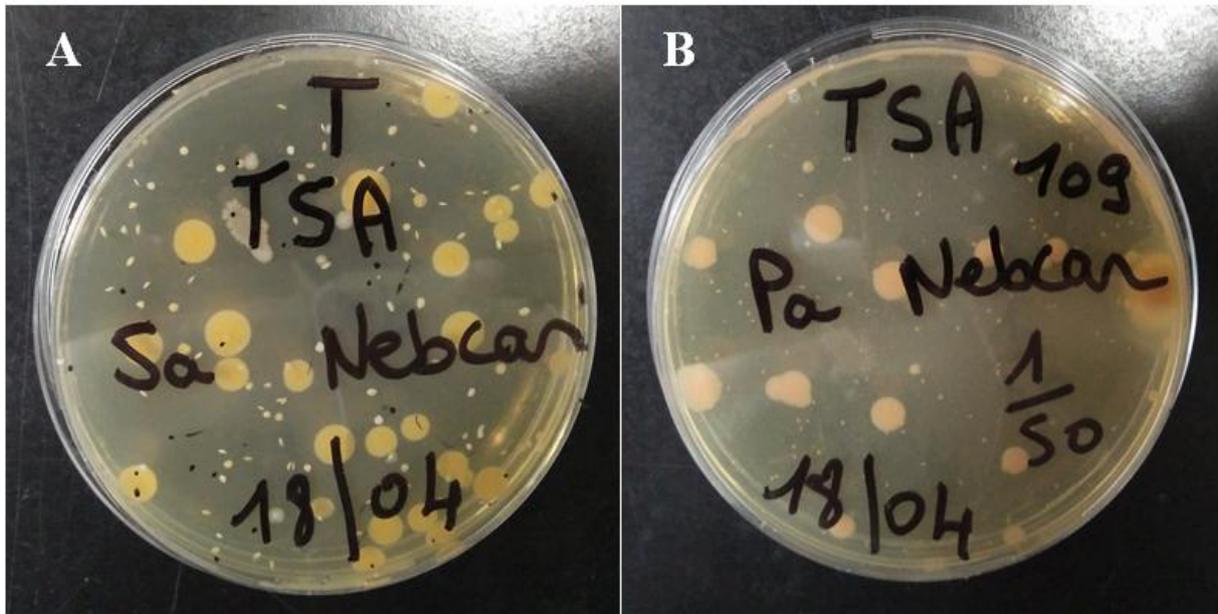
**Tableau 19** : Récapitulation des résultats obtenus pour le dénombrement des levures et moisissures pour le produit Abilizole®.

Milieux	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>Témoins UFC /ml</b>	TSA	79 ± 18
	SDA	32 ± 14
<b>Essais UFC/ml 1/10*</b>	TSA	74 ± 22
	SDA	33 ± 16
<b>Facteur F 1/10*</b>	TSA	69 ± 26
	SDA	42 ± 18
<b>Facteur F 1/10*</b>	TSA	82 ± 16
	SDA	27 ± 9
<b>Facteur F 1/10*</b>	TSA	0,87 ± 0,31
	SDA	1,24 ± 0,51
<b>Facteur F 1/10*</b>	TSA	1,16 ± 0,35
	SDA	0,9 ± 0,24

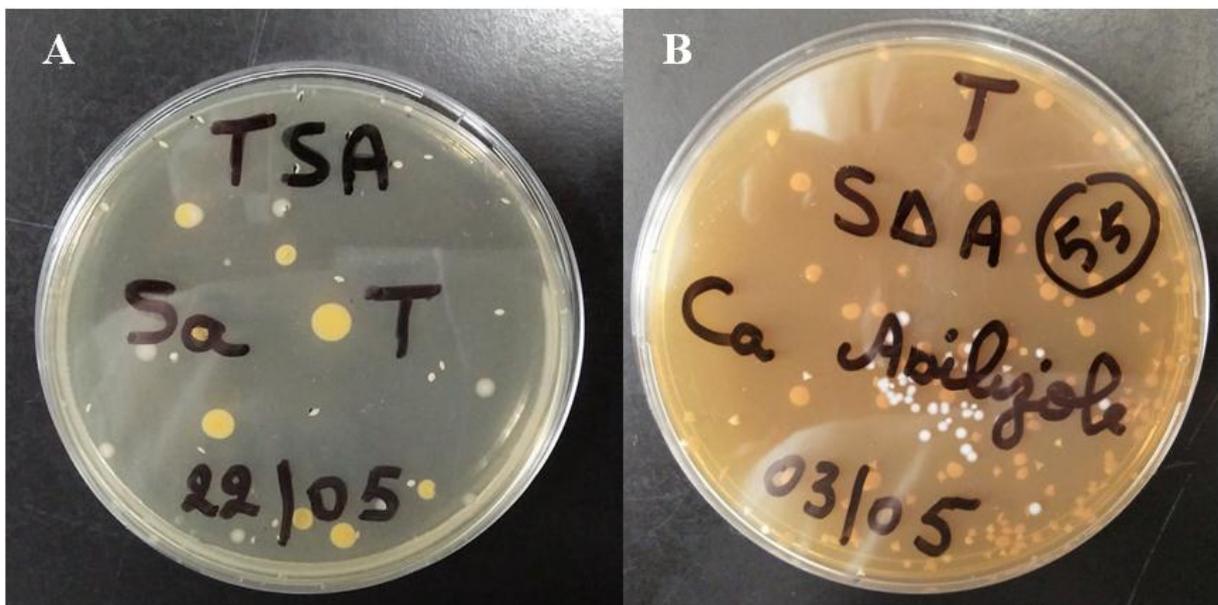
\* dilution du produit

Au terme de l'incubation des milieux TSA à 33-35°C pendant 3 à 5 jours et des milieux SDA à 23°C pendant 5 à 7 jours, nous avons dénombré les germes aérobies viables totaux et les levures et moisissures respectivement à l'aide d'un compteur de colonies.

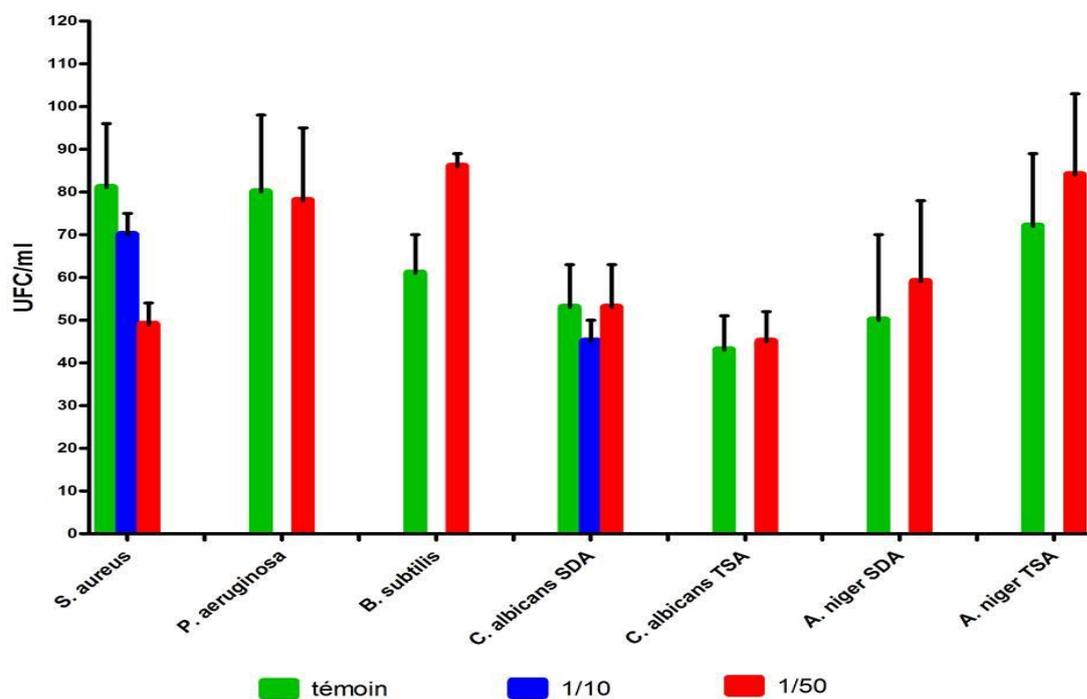
Les résultats obtenus pour les trois essais en présence du produit fini Nebcar® correspondent à une moyenne comprise entre 45 et 86 UFC/ml et celle des témoins en absence du produit comprise entre 43 et 81 UFC/ml (**Figure 20**). Ainsi, la moyenne qui correspond aux résultats obtenus pour les trois essais en présence du produit fini Abilizole® est comprise entre 27 et 82 UFC/ml et celle des témoins en absence du produit est comprise entre {32 et 79} UFC/ml (**Figure 21**). De plus, le facteur F calculé pour tous les tests réalisés était  $\leq 2$ . Ces résultats corroborent avec les normes préconisées par USP 2018 ( $UFC \leq 100$ ) et sont donc conformes



**Figure 18** : Résultats de la validation de la méthode de dénombrement des germes aérobies viables totaux (Nebcar®). (A) *Staphylococcus aureus* et (B) *Pseudomonas aeruginosa* (Originale, 2018)

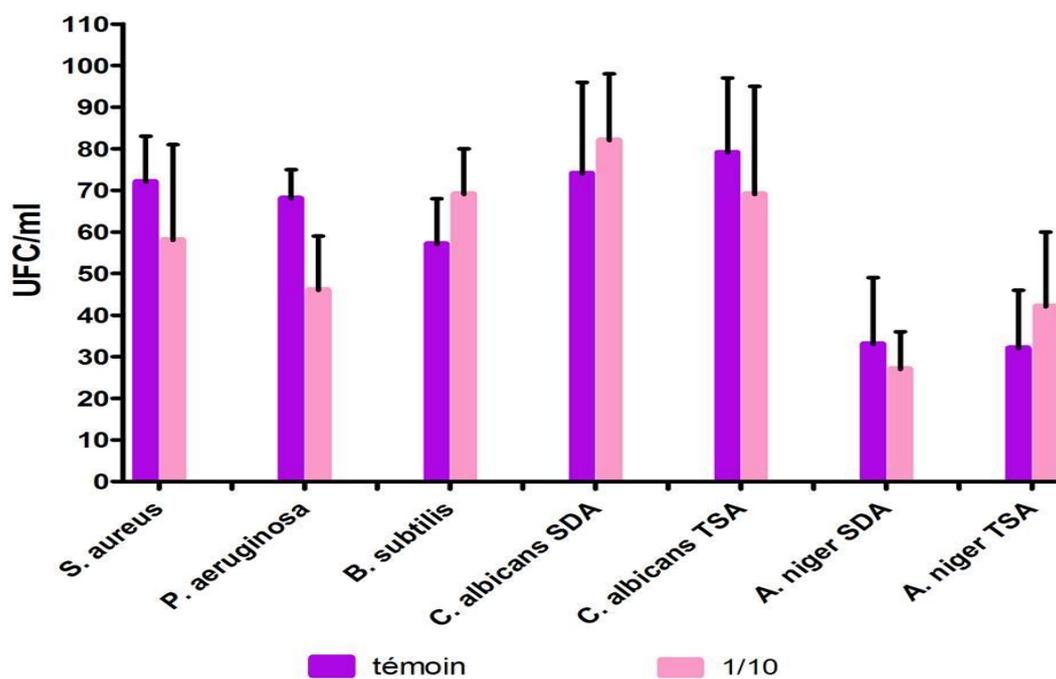


**Figure 19** : Résultats de la validation de la méthode de dénombrement des germes aérobies viables totaux (Abilizole®). (A) *Staphylococcus aureus* (Témoin) et (B) *Candida albicans* (Originale, 2018)



Témoin : diluant pH7 + Tween 80 (2%) sans produit fini (Nebcar<sup>®</sup>, 5 mg)

**Figure 20:** Diagramme en barres des résultats de dénombrement des souches en absence et en présence du produit Nebcar<sup>®</sup> (Originale, 2018)



Témoin : diluant pH7 + Tween 80 (2%) sans produit fini (Abilazole<sup>®</sup>)

**Figure 21 :** Diagramme en barres des moyennes des résultats de dénombrement des souches

De même, les diagrammes ci-dessus démontrent qu'il n'existe pas une grande différence entre les moyennes obtenues en absence et en présence des produits pour chaque souche, ceci suppose l'absence de substance inhibitrice dans les médicaments.

#### III.6.4. Résultats de la validation de la méthode de recherche des germes spécifiques

La validation des germes spécifiques se fait par la même méthode que celle utilisée pour les germes aérobies viables totaux, cependant dans le cas des germes spécifiques les résultats sont interprétés par la présence ou absence du germe et non par le comptage des colonies. Cette étude est préconisée par (USP, 2018) pour les médicaments administrés par voie orale.

Pour les différentes essais réalisées, les tableaux (20 et 21) représentent des récapitulatifs des résultats (Figure 22 et 23).

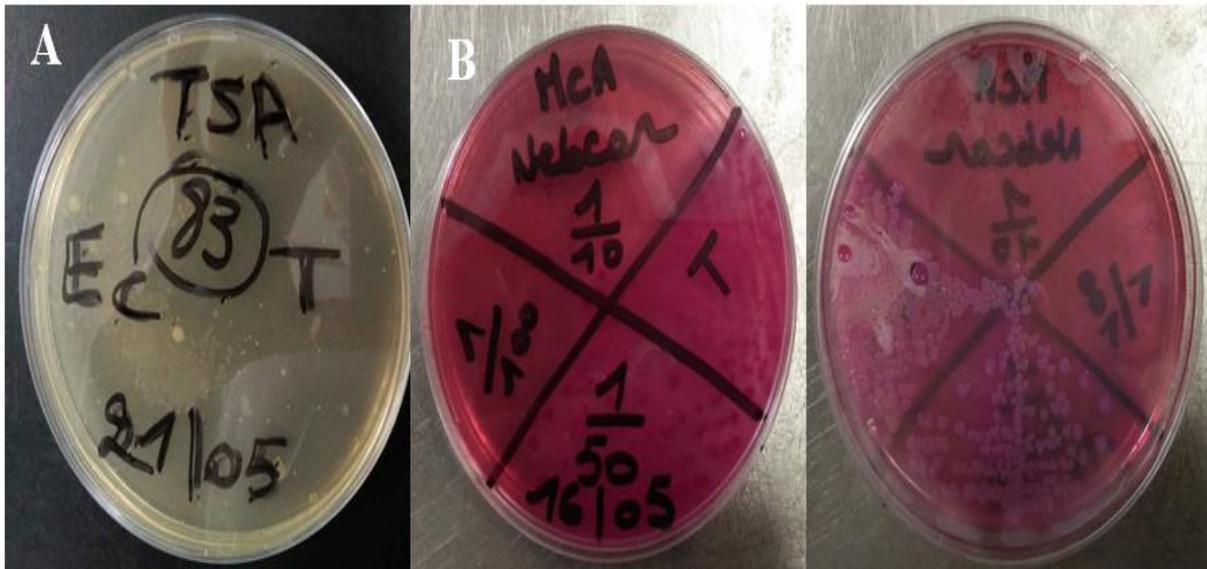
**Tableau 20:** Résultats de la validation de la recherche des germes spécifiques pour le produit Nebcar<sup>®</sup>

Germe	En absence du produit			En présence du produit		
	Témoin 1	Témoin 2	Témoin 3	Essai 1	Essai 2	Essai 3
<i>E. coli</i>	75	83	50	1/50	1/50	1/50
	Présence	Présence	Présence	Présence	Présence	Présence

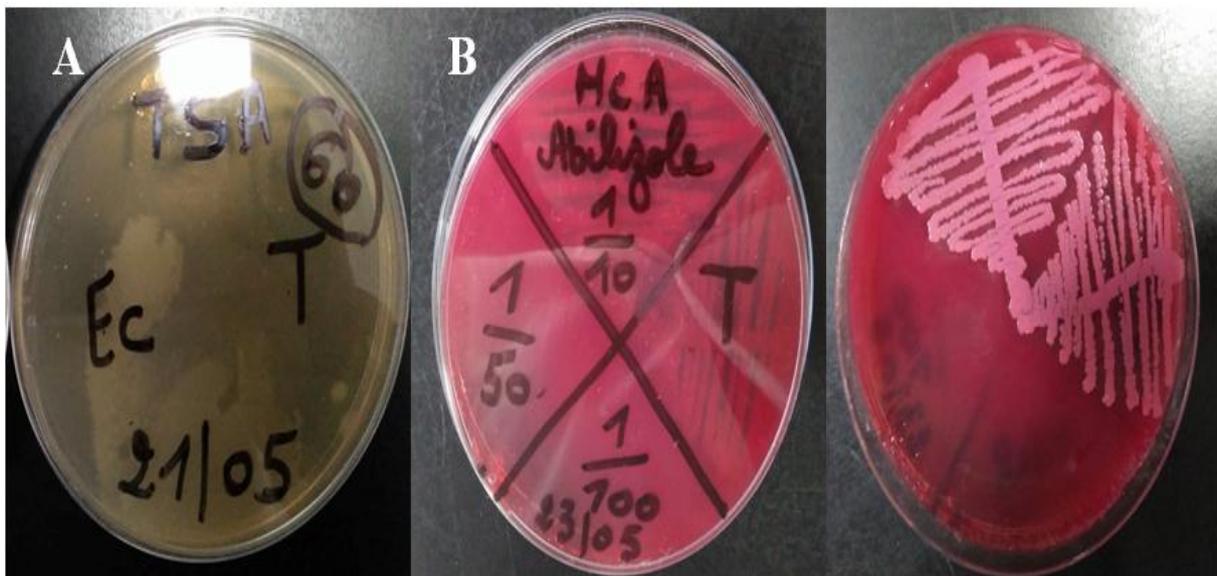
**Tableau 21 :** Résultats de la validation de la recherche des germes spécifiques pour le produit Abilizole<sup>®</sup>

Germe	En absence du produit			En présence du produit		
	Témoin 1	Témoin 2	Témoin 3	Essai 1	Essai 2	Essai 3
<i>E. coli</i>	60	83	76	1/10	1/10	1/10
	Présence	Présence	Présence	Présence	Présence	Présence

La contamination du témoin pH7 additionné au Tween 80 (2%) et les deux produits est suivi par l'étalement en surface du milieu MCA avec un inoculum d'*E.coli* d'environ 0,1 ml, après 24h d'incubation à 33-35°C, on observe l'apparition des colonies rose fushia caractéristiques de cette souche. Ces résultats correspondent à ce qui est prescrit dans USP, 2018 et montre que les deux produits sont dépourvus d'un agent inhibiteur de la croissance d'*E.coli*.



**Figure 22** : Résultats de la validation de la méthode de recherche des germes spécifiques (*E.coli*) pour le Nebcar<sup>®</sup>. (A) témoin et (B) essai (Originale, 2018)



**Figure 23** : Résultats de la validation de la méthode de recherche des germes spécifiques (*E.coli*) pour l'Abilizole<sup>®</sup>. (A) témoin et (B) essai (Originale, 2018)

**DISCUSSION**

**GÉNÉRALE**

#### IV. Discussion générale

La contamination des produits pharmaceutiques par les micro-organismes constitue un risque majeur dans l'industrie pharmaceutique car cela peut affecter l'intégrité du produit et la sécurité du patient. Pour prévenir les contaminations, les entreprises pharmaceutiques dans le monde entier sont tenues d'adhérer à des réglementations strictes et des procédures de contrôle de qualité rigoureuses (Tyski, 2011). Le contrôle de qualité microbiologique est de ce fait une partie essentielle du processus de fabrication pharmaceutique (**Guide to good manufacturing practice for medicinal products, 2013**).

En effet, l'objectif de cette étude est de valider l'utilisation d'une méthode de contrôle microbiologique pour déterminer la qualité des deux produits finis non obligatoirement stériles Nebcar<sup>®</sup> et Abilizole<sup>®</sup>.

L'eau étant un élément crucial dans l'industrie pharmaceutique, son contrôle microbiologique constitue une étape nécessaire et routinière, dans la présente étude l'eau purifiée et l'eau potable testées dans le laboratoire de Microbiologie de l'industrie pharmaceutique El-Kendi se sont révélées conformes aux normes préconisées par les pharmacopées.

De même, les résultats du contrôle environnemental ont montré une adéquation de la qualité de l'air actif et des surfaces des locaux de productions avec les normes décrites par les pharmacopées.

De plus, le premier contrôle microbiologique des nouveaux produits Nebcar<sup>®</sup> et Abilizole<sup>®</sup> avant la validation de la méthode a démontré une conformité des deux produits.

L'ensemble de ces résultats soulignent le respect des bonnes pratiques de laboratoires et la qualification du personnel au niveau des laboratoires El-Kendi.

Dans une deuxième partie la validation et la vérification de l'adéquation de la méthode utilisée dans le contrôle microbiologique des deux produits non obligatoirement stériles Nebcar<sup>®</sup> et Abilizole<sup>®</sup> a été entreprise. Les résultats ont montré une adéquation de la méthode pour le dénombrement des germes aérobies viables totaux, des levures et moisissures et la recherche des germes spécifiques dans les deux produits utilisés, et cela en utilisant des milieux dont la stérilité et le performance ont été vérifiés et assurés par des tests adaptés.

La dilution du produit étant un des facteurs influant sur la validation, au cours de notre travail, la dilution adéquate pour le contrôle microbiologique a été déterminée, les résultats montre que les dilutions 1/10 et 1/50 de Nebar<sup>®</sup> étaient adéquates et présentaient des résultats conformes aux normes recommandées par les pharmacopées et cela varie selon la souche à

contrôler entre 1/50 et 1/10. Tandis que la dilution adéquate pour Abilizole<sup>®</sup> est 1/10 pour toutes les souches testées.

Nous pouvons donc attester que toutes les souches testées sont toutes bien détectables aux dilutions (1/50 ou 1/10) pour le produit Nebar<sup>®</sup> et à la dilution 1/10 pour le produit Abilizole<sup>®</sup>, comme le démontre les résultats du Facteur F, les deux produits n'ont pas d'effet inhibiteur sur la fertilité des milieux.

**CONCLUSION**

**ET**

**PERSPECTIVES**

## Conclusion et perspectives

Le présent travail réalisé au laboratoire de contrôle de qualité microbiologique des médicaments a eu pour objectif principal la validation de la méthode d'analyses microbiologiques des deux produits finis non obligatoirement stériles : Nebcar<sup>®</sup> (Nebivolol, 5 mg) destiné au traitement de l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque chronique et Abilizole<sup>®</sup> (Aripiprazole, 1 mg/mL) destiné au traitement de la schizophrénie et les épisodes maniaques.

Au départ, le contrôle de stérilité et de fertilité des milieux de culture utilisés lors de notre étude s'est avéré conforme aux normes en vigueur préconisées par la Pharmacopée Américaine.

De plus, un contrôle de la qualité microbiologique de l'eau purifiée et potable, de l'environnement (air actif et surfaces) ainsi que les deux produits finis (médicaments Nebcar<sup>®</sup> et Abilizole<sup>®</sup>), avant validation de la méthode, a été effectué et a révélé que tous les paramètres analysés (germes aérobies viables totaux, levures et moisissures ainsi que les germes spécifiques, en l'occurrence *Escherichia coli*) sont en totale adéquation avec les normes recommandées de la Pharmacopée.

Par ailleurs et dans le but de valider la méthode de contrôle microbiologique pour ces eux nouveau génériques avant leur mises sur le marché, nous avons réalisé au moins 3 essais pour chaque test et les résultats se sont tous révélés d'une conformité totale aux exigences de la Pharmacopée Américaine. Ceci démontre que cette méthode donne des résultats fiables reproductibles et que nous pouvons ainsi valider le protocole de contrôle microbiologique de Nebcar<sup>®</sup> à la dilution 1/10 pour les souches de *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* et à la dilution 1/50 pour toutes les souches. Concernant Abilizole<sup>®</sup>, la méthodologie de contrôle microbiologique de cette suspension buvable est validée à la dilution 1/10 pour toutes les souches microbiennes.

Ainsi nous sommes rassurés quant à la fiabilité des procédés du laboratoire de microbiologie d'El Kendi, de la qualité et la sécurité microbienne des produits fabriqués par cette industrie et par conséquent de la compétence, de la bonne formation et du respect des BPF par le personnel ainsi que de la qualité des matières premières utilisées.

En perspectives de cette étude il serait intéressant d'insérer des méthodes microbiologiques rapides (MMR) dans le laboratoire de microbiologie de l'industrie

pharmaceutique El Kendi afin de réaliser les différents tests microbiologiques. Notamment que ces méthodes présentent plusieurs avantages, parmi lesquels un intérêt économique qui réside dans la réduction significative du temps des résultats par rapport aux méthodes traditionnelles, ce qui permet la libération rapide du produit dans le marché (**Peris-Vicente *et al.*, 2015**). De plus, les MMR permettent un échantillonnage continu et la collecte de données en temps réel. Par conséquent, plus d'analyses et des tests répétés pourraient être effectués à tous les stades de la production avec une amélioration du processus du contrôle (**Miller, 2005**).

**RÉFÉRENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

## A

- Ankri, J. (1999). Médicament et santé publique. *Actualité et dossier en santé publique*, n°27.
- Bassett, A., Addington, D., Cook, P., Dickson, R., Goldberg, J., Honer, W., Kopala, L., Malla, A., et Campbell, D. (1998). Canadian clinical practice guidelines for the treatment of schizophrenia. *CANADIAN JOURNAL OF PSYCHIATRY-REVUE CANADIENNE DE PSYCHIATRIE*, 43, 25S-40S.

## B

- Bonnes Pratiques de Fabrication. 2011, chapitre I, pp: 15-19.
- Bonnes Pratiques de Fabrication. 2008, chapitre I, pp: 20-22.

## C

- Chast, F. (2016). *Les médicaments en 100 questions*.
- Cline, R. R. (2007). Pharmaceutical Economics and Policy. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 71(3), 59.
- Costentin, J. (2009). Nouvelle stratégie pharmacologique dans la schizophrénie: les agonistes partiels des récepteurs dopaminergiques D2. Caractéristiques principales de l'aripiprazole. *L'Encéphale*, 35(1), 66-72.

## D

- Dessy, C., Saliez, J., Ghisdal, P., Daneau, G., Lobysheva, II, Frerart, F., Belge, C., Jnaoui, K., Noirhomme, P., Feron, O., et Balligand, J. L. (2005). Endothelial beta3-adrenoreceptors mediate nitric oxide-dependent vasorelaxation of coronary microvessels in response to the third-generation beta-blocker nebivolol. *Circulation*, 112(8), 1198-1205.
- Durant, D. V., et Jeune, C. L. (2017). *Guide pratique des médicaments* (37 ed.).

## E

- Ernoul, R. (2013). *Le grand livre de la qualité: management par la qualité dans l'industrie, une affaire de méthodes*: AFNOR éd.

## F

- FDA, U. (2014). ABILIFY MAINTENA™(aripiprazole) for extended-release injectable suspension, for intramuscular use: prescribing information.

## G

- Gao, Y. S., Nagao, T., Bond, R. A., Janssens, W. J., et Vanhoutte, P. M. (1991). Nebivolol induces endothelium-dependent relaxations of canine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, 17(6), 964-969.
- Gauthier, C., et Trochu, J. (2010). *Le nébivolol: premier bêtabloquant vasodilatateur à activité agoniste β3-adrénergique*. Paper presented at the Annales de Cardiologie et d'Angéiologie.
- Gouraud, A. (2012). Généralité sur la pharmacologie et les médicaments.
- Guide. (2013). Guide to good manufacturing practice for medicinal products. *Pharmaceutical Inspection Convention Pharmaceutical Inspection co-operation scheme, PE 009–10 (Part I)*.

## H

- Haute Autorité de Santé. (2005). Prise en charge des patients adultes atteints d'hypertension artérielle essentielle. Service des recommandations professionnelles. *PubMed/ Google Scholar*, 10-11.
- Husson, H.-P. (2011). *Matières premières pharmaceutiques, Mondialisation et Santé publique*. Paper presented at the Académie nationale de pharmacie, Paris.

J

Jondeau, G. (2006). Insuffisance cardiaque et cardiomyopathies. *ARCHIVES DES MALADIES DU CŒUR ET DES VAISSEAUX*, 99(2).

K

Kearney, P. M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P. K., et He, J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *The lancet*, 365(9455), 217-223.

Khan, M., et Akhtar, N. (2015). Regulation of stability studies to enhance the efficiency of drug registrations to regulatory authorities. *Archives of Pharmacy Practice*, 6(3), 48-57.

L

Lacroix, D. (2010). *Cardiologie Sous l'égide du Collège National des Enseignants de Cardiologie* (Issy-les-Moulineaux Elsevier Masson ed.).

Le Hir, A., et Janot, M. (2001). Pharmacie galénique(bonnes pratiques de fabrication des médicaments). *Abrégés de pharmacie*.

LeHir, A. (2009). Vie d'un médicament de la conception aux bonnes pratiques de fabrication: Abrégés de pharmacie galénique, Bonnes pratiques de fabrication des médicaments. 9ème édition, Masson, 4-8.

LeHir, A., et Brossard, D. (1997). *Pharmaco-galénique* (9eme ed.).

Limosin, F., Azorin, J., Krebs, M., Millet, B., Glikman, J., Camus, V., Crocq, M., Costentin, J., et Daléry, J. (2008). Données actuelles et modalités d'utilisation de l'aripiprazole dans le traitement de la schizophrénie. *L'Encéphale*, 34(1), 82-92.

Llorca, P., Chrpeaud, T., et Samalin, L. (2012). Etats mixtes. *L'Encéphale*, 38, S155-S159.

Logeart, D., et Solal, A. C. (2010). Intérêt des bêtabloquants vasodilatateurs dans l'insuffisance cardiaque. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, 59(3), 160-167.

M

Maffei, A., Di Pardo, A., Carangi, R., Carullo, P., Poulet, R., Gentile, M. T., Vecchione, C., et Lembo, G. (2007). Nebivolol induces nitric oxide release in the heart through inducible nitric oxide synthase activation. *Hypertension*, 50(4), 652-656.

Meder, H., Baumstummel, A., Chollet, R., Barrier, S., Kukuczka, M., Olivieri, F., Welterlin, E., Beguin, V., Ribault, S., et Bastien. (2012). Fluorescence-Based Rapid Detection of Microbiological Contaminants in Water Samples. *The Scientific World Journal*, 2012, 10.

Miller, M. (2005). Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. *DHI Publishing, LLC: River Grove, IL*.

Mugoyela, V., et Mwambete, K. D. (2010). Microbial contamination of nonsterile pharmaceuticals in public hospital settings. *Therapeutics and clinical risk management*, 6, 443.

Munzel, T., et Gori, T. (2009). Nebivolol: the somewhat-different beta-adrenergic receptor blocker. *J Am Coll Cardiol*, 54(16), 1491-1499.

O

OMS. (1998). Assurance de la qualité des produits pharmaceutiques: recueil de directives et autres documents; vol. 1.

Organisation mondiale de santé. (2006). Supplementary guidelines on good manufacturing practices (GMP): Validation. *WHO, Geneva*, 3-38.

P

Pacific, C. (2006). Les formes pharmaceutiques.

Peris-Vicente, J., Carda-Broch, S., et Esteve-Romero, J. (2015a). Validation of rapid microbiological methods. *Journal of laboratory automation*, 20(3), 259-264.

Peris-Vicente, J., Carda-Broch, S., et Esteve-Romero, J. (2015b). Validation of rapid microbiological methods. *J Lab Autom*, 20(3), 259-264.

Pignatti, F., Aronsson, B., Gate, N., Vamvakas, S., Wade, G., Moulon, I., et Le Courtois, P. (2002). The review of drug applications submitted to the European Medicines Evaluation Agency: frequently raised objections, and outcome. *Eur J Clin Pharmacol*, 58(9), 573-580.

Pharmacopée Européenne (2008):

a-"5.1.4": Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques

b-"2.6.12": Contrôle microbiologique des produits non stériles; dénombrement des germes aérobies viables totaux

c-"2.6.13": Contrôle microbiologique des produits non stériles; recherche de microorganismes spécifiés

### R

Ratajczak, M., Kubicka, M., Kamińska, D., Sawicka, P., et Długaszewska, J. (2015). Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 303-307.

Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Zähringer, U., Seydel, U., et Di Padova, F. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *The FASEB Journal*, 8(2), 217-225.

Riley, B. S. (2004). Rapid microbiology methods in the pharmaceutical industry. *American Pharmaceutical Review*, 7, 28-31.

### S

Samalin, L., Charpeaud, T., et Llorca, P.-M. (2014). Aripiprazole injectable à libération prolongée dans le traitement de maintenance de la schizophrénie. *L'Encéphale*, 40(6), 487-494.

Scott, J., et Leboyer, M. (2011). Consequences of delayed diagnosis of bipolar disorders. *L'Encéphale*, 37, S173-S175.

Scriban, R. (1999). Biotechnologie. 5ème édition, Tec. et doc. *Lavoisier, Paris, France*.

Sengupta, P., Chatterjee, B., et Tekade, R. K. (2018). Current regulatory requirements and practical approaches for stability analysis of pharmaceutical products: A comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutics*, 543(1), 328-344.

Shirley, M., et Perry, C. M. (2014). Aripiprazole (ABILIFY MAINTENA®): a review of its use as maintenance treatment for adult patients with schizophrenia. *Drugs*, 74(10), 1097-1110.

Siddiqui, M. R., AlOthman, Z. A., et Rahman, N. (2017). Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1409-S1421.

### T

Tait, K. D. (2015). *Encyclopédie de sécurité et de santé au travail*.

Talbert, M., et Willoquet, G. (2017). *Guide pharmaco clinique* (5 ed.).

Tyski, S. (2011). How to manufacture a pure and safe drug. *Pharm. Ind*(4), 57-61.

### U

USP 31-NF26 (2012), article "1227": Validation of microbial recovery from pharmacopeial articles, 687p.

USP (2018). Pharmaceutical water 05. Volume NO.30(5)Page1744

### V

Vadeville, P. (1983). *Gestion et contrôle de la qualité, Association Française de normalisation* (MASSON, Paris ed.).

### W

Wehrlé, P. (2007). *Pharmacie galénique: formulation et technologie pharmaceutique*: Maloine.

World Health Organization. (2011). WHO good practices for pharmaceutical microbiology laboratories. *WHO Technical Report Series, 961*.

# ANNEXES

# Annexe 1

Règne	Bacteria
Embranchement	Firmicutes
Classe	Bacille
Ordre	Bacillales
Famille	Staphylococcaceae
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

Règne	Bacteria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	Gamma proteobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Famille	pseudomonadaceae
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Règne	Bacteria
Embranchement	Firmicutes
Classe	Bacille
Ordre	Bacillales
Famille	Bacillaceae
Genre	<i>Bacillus</i>
Espèce	<i>Bacillus subtilis</i>

Règne	Bacteria
Embranchement	Firmicutes
Classe	Gamma proteobacteria
Ordre	Enterobacteriales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli</i>

Règne	Fungi
Embranchement	Ascomycota
Classe	Saccharomycetes
Ordre	Saccharomycetales
Famille	Saccharomycetaceae
Genre	<i>Candida</i>
Espèce	<i>Candida albicans</i>

Règne	Fungi
Embranchement	Ascomycota
Classe	Eurotiomycetes
Sous- classe	Eurotiomycetidae
Ordre	Eurotiales
Famille	Trichocomaceae
Genre	<i>Aspergillus</i>
Espèce	<i>Aspergillus niger</i>

**Annexe 2**

<b>Equipements avec références</b>	
<b>Verrerie</b>	<b>Appareillage</b>
Pipettes graduées (2ml, 5ml, 10ml).	Autoclave horizontal : De LAMA 3273. Autoclave vertical : De LAMA 2996.
Pipettes Pasteur.	Hotte à flux laminaire vertical : AV-100 TELSTAR.
	Réfrigérateur : LIEBHERR.
Micropipettes graduées	Bec Bunsen : Fuego.
	Compteur de colonies : FUNKE GERBER colony star.
Flacons en verre de 100ml, 250ml, 500ml, 1L.	La balance de précision : SARTORUISED62-35-OCE.
	Vortex : Génie touch Mixer.
Boites de petri de 9cm de diamètre.	Bain-marie : GEL 1086.
	Incubateur de 22C° : BINDER KB 115 Incubateur de 35C° : BINDER BF 400 Incubateur de 42C° : BINDER BF 400
Anse de platine.	Ph mètre : Mettlertoledo.

### Annexe 3

#### Solution tampon peptonnée au chlorure de sodium Ph7

<b>Phosphate monopotassique</b>	3,6 g
<b>Phosphate disodiquedihydrate</b>	7,2g
<b>Chlorure de sodium</b>	4,3g
<b>Peptone de viande ou de caséine</b>	1,0g
<b>Eau purifiée</b>	1000mL

#### Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja TSA

<b>Peptone pancréatique de caséine</b>	15g
<b>Peptone papaique de soja</b>	5g
<b>Chlorure de sodium</b>	5g
<b>Agar</b>	15g
<b>Eau purifiée</b>	1000mL

#### Milieu sabouraud dextrose-gélose SDA

<b>Dextrose</b>	40g
<b>Mélange de peptone peptique de tissu animal et de peptone</b>	10g
<b>Pancréatique de caséine</b>	10g
<b>Agar</b>	15g
<b>Eau purifiée</b>	1000mL

#### Milieu gélose de Mac Conkey MCA

<b>Hydrolysate pancréatique de gélatine</b>	17g
<b>Peptones de viande et de caséine</b>	3g
<b>Lactose monohydrate</b>	10g
<b>Chlorure de sodium</b>	5g
<b>Sels biliaires</b>	1,5g
<b>Agar</b>	13,5g
<b>Rouge neutre</b>	30g
<b>Violet cristallise</b>	1g
<b>Eau purifiée</b>	1000mL

### Milieu liquide de Mac Conkey MCB

<b>Hydrolysate pancréatique de gélatine</b>	20g
<b>Lactose monohydrate</b>	10g
<b>Bile de bœuf</b>	5g
<b>Déshydratée Pourpre de bromocrésol</b>	10g
<b>Eau purifiée</b>	1000mL

### Milieu liquide aux peptones de caséine et de soja TSB

<b>Peptone pancréatique de caséine</b>	17g
<b>Peptone papaique de soja</b>	3g
<b>Chlorure de sodium</b>	5g
<b>Phosphate di potassique</b>	2,5g
<b>Glucose monohydrate</b>	2,5g
<b>Eau purifiée</b>	1000mL

### Reasoners 2 Agar ( R2A)

<b>Extrait de levure</b>	0,5g
<b>Protéase peptone</b>	0,5g
<b>Hydrolysate de caséine</b>	0,5g
<b>Glucose</b>	0,5g
<b>Amidon</b>	0,5g
<b>Pyruvate de sodium</b>	0,3g
<b>Hydrogénophosphate de di- potassium</b>	0,3g
<b>Sulfate de magnésium anhydre</b>	0,024g
<b>Agar-agar</b>	15g
<b>Eau purifiée</b>	1000ml

### Gélose au Cétrimide

<b>Peptone de gélatine</b>	20 g
<b>Bromure de tétradonium (Cétrimide)</b>	0,3g
<b>Sulfate de potassium</b>	10g
<b>Chlorure de magnésium</b>	1,4g
<b>Agar- agar</b>	13,6g
<b>Eau purifiée</b>	1000 ml

**Annexe 4**

Milieux de culture	Souches utilisées	Inoculum standardisé (ml)	Dilution	UFC standardisé
<b>TSA</b>	<i>P.aeruginosa</i>	1.6	10 <sup>-7</sup>	97
	<i>S.aureus</i>	1	10 <sup>-7</sup>	101
	<i>B.subtilis</i>	0.7	10 <sup>-5</sup>	101
	<i>C.albicans</i>	1.1	10 <sup>-5</sup>	106
	<i>A.niger</i>	0.5	10 <sup>-2</sup>	90
<b>TSB</b>	<i>P.aeruginosa</i>	2.3	10 <sup>-7</sup>	96
	<i>S.aureus</i>	1	10 <sup>-7</sup>	100
	<i>B.subtilis</i>	1	10 <sup>-5</sup>	103
	<i>C.albicans</i>	1	10 <sup>-5</sup>	95
	<i>A.niger</i>	0.5	10 <sup>-2</sup>	102
<b>SDA</b>	<i>C.albicans</i>	1.1	10 <sup>-5</sup>	106
	<i>A.niger</i>	0.7	10 <sup>-2</sup>	100
<b>MCB</b>	<i>E.coli</i>	0.2	10 <sup>-6</sup>	100
<b>MCA</b>	<i>E.coli</i>	0.2	10 <sup>-6</sup>	85

## Annexe 5

Souches	UFC/ml de dilution		
	Test 1	Test 2	Test 3
<i>P. aeruginosa</i>	90 / $10^{-7}$ 0,90 x $10^2$ / $10^{-7}$ 0,90 x $10^3$ / $10^{-6}$ 0,90 x $10^4$ / $10^{-5}$ 0,90 x $10^5$ / $10^{-4}$ <b>9 x <math>10^4</math> / <math>10^{-4}</math></b>	18 / $10^{-7}$ 0,18 x $10^2$ / $10^{-7}$ 0,18 x $10^3$ / $10^{-6}$ 0,18 x $10^4$ / $10^{-5}$ 0,18 x $10^5$ / $10^{-4}$ <b>1,8 x <math>10^4</math> / <math>10^{-4}</math></b>	80 / $10^{-7}$ 0,80 x $10^2$ / $10^{-7}$ 0,80 x $10^3$ / $10^{-6}$ 0,80 x $10^4$ / $10^{-5}$ 0,80 x $10^5$ / $10^{-4}$ <b>8 x <math>10^4</math> / <math>10^{-4}</math></b>
<i>S. aureus</i>	91 / $10^{-7}$ 0,91 x $10^2$ / $10^{-7}$ 0,91 x $10^3$ / $10^{-6}$ 0,91 x $10^4$ / $10^{-5}$ 0,91 x $10^5$ / $10^{-4}$ <b>9,1 x <math>10^4</math> / <math>10^{-4}</math></b>	60 / $10^{-7}$ 0,60 x $10^2$ / $10^{-7}$ 0,60 x $10^3$ / $10^{-6}$ 0,60 x $10^4$ / $10^{-5}$ 0,60 x $10^5$ / $10^{-4}$ <b>6 x <math>10^4</math> / <math>10^{-4}</math></b>	66 / $10^{-7}$ 0,66 x $10^2$ / $10^{-7}$ 0,66 x $10^3$ / $10^{-6}$ 0,66 x $10^4$ / $10^{-5}$ 0,66 x $10^5$ / $10^{-4}$ <b>6,6 x <math>10^4</math> / <math>10^{-4}</math></b>
<i>B. subtilis</i>	188 / $10^{-5}$ 1,88 x $10^2$ / $10^{-5}$ 1,88 x $10^3$ / $10^{-4}$ <b>1,88 x <math>10^4</math> / <math>10^{-3}</math></b>	216 / $10^{-5}$ 2,16 x $10^2$ / $10^{-5}$ 2,16 x $10^3$ / $10^{-4}$ <b>2,16 x <math>10^4</math> / <math>10^{-3}</math></b>	242 / $10^{-5}$ 2,42 x $10^2$ / $10^{-5}$ 2,42 x $10^3$ / $10^{-4}$ <b>2,42 x <math>10^4</math> / <math>10^{-3}</math></b>
<i>C. albicans</i>	107 / $10^{-5}$ 1,07 x $10^2$ / $10^{-5}$ 1,07 x $10^3$ / $10^{-4}$ <b>1,07 x <math>10^4</math> / <math>10^{-3}</math></b>	98 / $10^{-5}$ 0,98 x $10^2$ / $10^{-5}$ 0,98 x $10^3$ / $10^{-4}$ <b>0,98 x <math>10^4</math> / <math>10^{-3}</math></b>	222 / $10^{-5}$ 2,22 x $10^2$ / $10^{-5}$ 2,22 x $10^3$ / $10^{-4}$ <b>2,22 x <math>10^4</math> / <math>10^{-3}</math></b>
<i>A.niger</i>	252 / $10^{-2}$ 2,52 x $10^2$ / $10^{-2}$ 2,52 x $10^3$ / $10^{-1}$ <b>2,52 x <math>10^4</math> / <math>10^{-0}</math></b>	112 / $10^{-3}$ 1,12 x $10^2$ / $10^{-3}$ 1,12 x $10^3$ / $10^{-2}$ <b>1,12 x <math>10^4</math> / <math>10^{-1}</math></b>	80 / $10^{-3}$ 0,80 x $10^2$ / $10^{-3}$ 0,80 x $10^3$ / $10^{-2}$ 0,80 x $10^4$ / $10^{-1}$ 0,80 x $10^5$ / $10^{-0}$ <b>8 x <math>10^4</math> / <math>10^{-0}</math></b>
<i>E.coli</i>	57 / $10^{-7}$ 0,57 x $10^2$ / $10^{-7}$ 0,57 x $10^3$ / $10^{-6}$ 0,57 x $10^4$ / $10^{-5}$ 0,57 x $10^5$ / $10^{-4}$ <b>5,7 x <math>10^4</math> / <math>10^{-4}</math></b>	60 / $10^{-6}$ 0,60 x $10^2$ / $10^{-6}$ 0,60 x $10^3$ / $10^{-5}$ 0,60 x $10^4$ / $10^{-4}$ 0,60 x $10^5$ / $10^{-3}$ <b>6 x <math>10^4</math> / <math>10^{-3}</math></b>	14 / $10^{-7}$ 0,14 x $10^2$ / $10^{-7}$ 0,14 x $10^3$ / $10^{-6}$ 0,14 x $10^4$ / $10^{-5}$ 0,14 x $10^5$ / $10^{-4}$ <b>1,4 x <math>10^4</math> / <math>10^{-4}</math></b>

**Annexe 5: Résultats de la mesure de la charge microbienne pour le produit Nebcar®**

## Annexe 6

Souches	UFC/ml de dilution					
	Test 1		Test 2		Test 3	
<i>P.aeruginosa</i>	72	/ 10 <sup>-7</sup>	80	/ 10 <sup>-6</sup>	145	/ 10 <sup>-6</sup>
	0,72 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-7</sup>	0,80 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-6</sup>	1,45 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-6</sup>
	0,72 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-6</sup>	0,80 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-5</sup>	1,45 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-5</sup>
	0,72 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-5</sup>	0,80 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>	1,45 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>
	0,72x 10 <sup>5</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>	0,80 x 10 <sup>5</sup>	/ 10 <sup>-3</sup>		
	7,2 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>	8 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-3</sup>		
<i>S. aureus</i>	72	/ 10 <sup>-7</sup>	75	/ 10 <sup>-7</sup>	53	/ 10 <sup>-7</sup>
	0,72 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-7</sup>	0,75 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-7</sup>	0,53 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-7</sup>
	0,72 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-6</sup>	0,75 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-6</sup>	0,53 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-6</sup>
	0,72 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-5</sup>	0,75 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-5</sup>	0,53 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-5</sup>
	0,72x 10 <sup>5</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>	0,75x 10 <sup>5</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>	0,53x 10 <sup>5</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>
	7,2 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>	7,5 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>	5,3x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>
<i>B.subtilis</i>	160	/ 10 <sup>-5</sup>	216	/ 10 <sup>-5</sup>	242	/ 10 <sup>-4</sup>
	1,60 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-5</sup>	2,16 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-5</sup>	2,42 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>
	1,60 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>	2,16 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>	2,42 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-3</sup>
	1,60 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-3</sup>	2,16 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-3</sup>	2,42 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-2</sup>
<i>C.albicans</i>	60	/ 10 <sup>-5</sup>	80	/ 10 <sup>-5</sup>	156	/ 10 <sup>-5</sup>
	0,60 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-5</sup>	0,80 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-5</sup>	1,56 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-5</sup>
	0,60 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>	0,80 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>	1,56 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>
	0,60 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-3</sup>	0,80 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-3</sup>	1,56 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-3</sup>
	0,60 x 10 <sup>5</sup>	/ 10 <sup>-2</sup>	0,80 x 10 <sup>5</sup>	/ 10 <sup>-2</sup>		
	6 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-2</sup>	8 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-2</sup>		
<i>A.niger</i>	64	/ 10 <sup>-3</sup>	66	/ 10 <sup>-3</sup>	195	/ 10 <sup>-2</sup>
	0,64 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-3</sup>	0,66 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-3</sup>	1,95 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-2</sup>
	0,64 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-2</sup>	0,66 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-2</sup>	1,95 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-1</sup>
	0,64 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-1</sup>	0,66 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-1</sup>	1,95 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>0</sup>
	0,64 x 10 <sup>5</sup>	/ 10 <sup>0</sup>	0,66 x 10 <sup>5</sup>	/ 10 <sup>0</sup>		
	6,4 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>0</sup>	6,6 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>0</sup>		
<i>E.coli</i>	60	/ 10 <sup>-6</sup>	82	/ 10 <sup>-7</sup>	47	/ 10 <sup>-7</sup>
	0,60 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-6</sup>	0,82 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-7</sup>	0,47 x 10 <sup>2</sup>	/ 10 <sup>-7</sup>
	0,60 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-5</sup>	0,82 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-6</sup>	0,47 x 10 <sup>3</sup>	/ 10 <sup>-6</sup>
	0,60 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>	0,82 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-5</sup>	0,47 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-5</sup>
	0,60 x 10 <sup>5</sup>	/ 10 <sup>-3</sup>	0,82x 10 <sup>5</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>	0,47x 10 <sup>5</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>
	6 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-3</sup>	8,2 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>	4,7 x 10 <sup>4</sup>	/ 10 <sup>-4</sup>

Annexe 6: Résultats de la mesure de la charge microbienne pour le produit Abilizole®