



République Algérienne Démocratique et Populaire
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE SAAD DAHLEB - BLIDA 1 –

FACULTE DE MEDECINE

El mahdi SI AHMED

DEPARTEMENT DE PHARMACIE

Thèse d'exercice de fin d'études

Présentée En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

Présentée publiquement le 20/07/2023

THEME

**Contrôle qualité des préparations pharmaceutiques
liquides non stériles : applications aux contrôles
microbiologiques**

Présenté par :

- SELMANI Meriem
- TAMARANTE Yasmina

Devant le jury :

- Président de jury : Dr MAHFOUD. M *Maitre-assistant en Microbiologie médicale*
- *Examineur* : Dr DJELOULI. S *Maitre-assistant en Pharmacologie*
- Promoteur : Dr BENGHEZAL. I *Maître-assistant en Biophysique Pharmaceutique*

Session : Juillet 2023

Remerciements

Nous remercions Dieu le tout puissant et miséricordieux, de nous donner la force et la patience d'accomplir ce parcours, de nous ouvrir les portes du savoir et de nous avoir permis d'être ce que nous sommes devenus.

Nous voudrions tout d'abord adresser toutes nos reconnaissances à notre promoteur **Dr. BENGHEZAL. I** Maitre-assistant en Biophysique à l'université de Blida 1 pour nous avoir fait l'honneur de diriger ce travail et pour nous avoir permis grâce à ses compétences de le mener à terme, pour sa constante disponibilité malgré ses occupations et responsabilités, pour ses précieux conseils et surtout pour sa confiance.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions

Dr. MAHFOUD. M Maitre-assistant en microbiologie médicale à l'université de Blida 1 Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de mémoire, Merci d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail, soyez assuré de notre profond respect et de notre reconnaissance.

Dr. DJELOULI. S Maitre-assistant en pharmacologie à l'université de Blida 1 d'avoir accepté d'évaluer notre travail, c'est un honneur de vous avoir comme membres de jury.

Nos remerciements s'étendent également à tous nos professeurs qui ont contribué à la formation et l'encadrement dont nous avons bénéficié tout au long de notre cursus en pharmacie.

Nous tenons à remercier spécialement toute l'équipe du laboratoire de contrôle qualité « contrôle microbiologique » du groupe El kendi ainsi que du groupe Saidal pour leur excellent accueil, leur collaboration et leur serviabilité.

Nous tenons à exprimer notre gratitude et nos sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

C'est avec une profonde gratitude et une immense joie que je dédie ce mémoire à mon père, mon support dans la vie, qui est toujours à mes côtés avec une grande patience. Mon héros, qui m'a arrosé de tendresse et d'espoir. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon amour et ma considération pour leurs sacrifices.

A ma mère, à celle qui m'a donné la vie, qui attend ce jour avec impatience et qui n'a jamais cessé de formuler des prières à mon égard.. Merci mon trésor.

A mes frères et mes sœurs, particulièrement "Nezha" ce n'est pas juste une sœur mais une deuxième maman, qui m'a appris, m'a supporté et m'a dirigé vers la gloire, sans elle je ne serais pas là aujourd'hui.

A tous mes neveux et mes nièces, qui sont vraiment une source de bonheur, je vous aime du fond du cœur, que dieu vous garde pour nous et pour vos parents.

A Mes meilleures amies, on a passé d'agréables moments ensemble. Je vous exprime toute mon affection et je vous souhaite à tous beaucoup de réussite et du bonheur.

A une femme, qui m'a appris beaucoup dans mon parcours, une femme très courageuse. Merci "Dr Namaoui Fouzia" pour tes encouragements, tes efforts, ta spontanéité et ta compréhension.

Yasmin

Dédicaces

C'est avec une profonde reconnaissance que je dédie ce travail

A mon père décédé y a deux ans, mon modèle, un homme dont je suis fière, un homme qui a tout fait pour me voir à ce jour-là.

A ma sœur Naima, la plus tendre des sœurs qui est parti très tôt et que grâce à elle j'ai fait cette spécialité.

J'espère qu'ils seront fiers de moi là où ils sont.

A ma mère la prunelle de mes yeux, qui a été toujours à mes côtés. Aucune dédicace ne saurait exprimer ma gratitude pour toi ma chère maman, Puisse Dieu, le tout puissant te combler de santé, de bonheur et te procurer une longue vie.

A mon cher frère Hamza qui m'a beaucoup aidé dans la réalisation de ce manuscrit, Merci pour tes efforts, tes encouragements et tes conseils

A mes chers frères Mohamed et Elhadi, Merci pour votre soutien et votre support.

A mon cher fiancé Mohamed, merci pour ton soutien moral et ton encouragement.

A mes copines, ma cousine Khaoula, et à toute ma famille.

Meriem

Liste des Abréviations

A

AMM autorisation de mise sur le marché
API Appareils et Procédés d'Identification

B

BPF Bonnes pratiques de fabrication
BPL Bonnes pratiques de laboratoire

D

DGAT dénombrement des germes aérobies totaux
DMLT dénombrement des moisissures et levures totales

E

E. Coli Escherichia Coli
EHEC Enterohemorragic Escherichia coli
EIEC Enteroinvasive Escherichia Coli
EPEC Enteropathogenic Escherichia coli
ETEC Enterotoxigenic Escherichia coli

G

g gramme

I

ICH International Conference on Harmonization

M

ml millilitre

N

NF National Formulary
NPP nombre le plus probable

P

PA Principe actif
pH Potentiel Hydrogène

Ph. Eur Pharmacopée européenne
Pmda Pharmaceuticals and medical devices Agency

R

Rodac replicate organism detection and counting

S

SDA Sabouraud Dextrose Agar
SHU syndrome hémolytique et urémique

T

TSA tryptone soja agar
TSB bouillon tryptone soja
TSE tryptone sel eau

U

USP United States Pharmacopeia

Liste des figures

Figure 1 : formule chimique de Méthylparabène	19
Figure 2 : formule chimique de Propylparabène	20
Figure 3 : formule chimique de l'acide benzoïque	21
Figure 4 : formule chimique de l'acide sorbique	22
Figure 5: Lieu de stage 1	28
Figure 6 : Présentation de département "microbiologie" de laboratoire du contrôle de la qualité de SAIDAL	29
Figure 7: Lieu de stage 2	30
Figure 8 : Présentation du laboratoire de contrôle qualité d'EL KENDI	30
Figure 9: VITAFORM polyvitamine Solution buvable.....	31
Figure 10 : Composition de VITAFORM polyvitamine	32
Figure 11: Ezilax Sirop	32
Figure 12: Schéma illustrant l'échantillonnage de VITAFORM Polyvitamine	34
Figure 13: Schéma illustrant le contrôle microbiologique du VITAFORM Polyvitamine	37
Figure 14: Le processus de contrôle microbiologique du produit fini Ezilax® sirop 10g/15ml.	40
Figure 15 : Le contrôle sur des témoins négatifs pour une vérification des conditions opératoires.	41
Figure 16 Préleveur d'air RCS®	42
Figure 17 Stripes d'agar	42
Figure 18 Adaptateur d'un préleveur d'air RCS	42
Figure 19 : sédimentation des boîtes de pétri	42
Figure 20: Contrôle microbiologique des surfaces	43
Figure 21 : Aspect macroscopique de DGAT dans le milieu gélosé TSA	44
Figure 22 : Aspect macroscopique de DMLT dans le milieu gélosé sabouraud dextrose	45
Figure 23: Aspect macroscopique des résultats de la recherche d'E. Coli dans la gélose MacConkey.....	45
Figure 24: Les résultats du contrôle microbiologique du produit fini Lactulose® sirop sur des milieux gélosé TSA, SDA et MacConkey successivement.....	48
Figure 25: Strip d'agar d'un contrôle microbiologique de l'air au niveau d'une salle de compression.....	49

Figure 26: Résultat d'un contrôle microbiologique d'une surface au niveau du couloir de la zone de la production.	50
Figure 27 Mécanisme action des laxatifs osmotiques	60

Liste des tableaux

Tableau 1 Critères d'acceptation de la qualité microbiologique des formes pharmaceutiques non stériles [2]	16
Tableau 2 : Les germes recherchés, les milieux de culture utilisés et leurs conditions d'incubation.....	39
Tableau 3 : Les milieux de culture utilisés et leurs conditions d'incubation dans la recherche d'Escherichia coli.	39
Tableau 4 Résultats du contrôle de la qualité microbiologique de la solution buvable VITAFORM Polyvitamine	46
Tableau 5 : Résultats de dénombrement des germes aérobies viables totaux et Levures et Moisissures	47
Tableau 6 Résultats de contrôle microbiologique de l'air au niveau de différentes zones	48
Tableau 7 Résultats de contrôle microbiologique des surfaces au niveau de la zone de production	49
Tableau 8 composition des milieux de culture	57

I. Table des matières

<i>Remerciements</i>	<i>I</i>
<i>Dédicaces</i>	<i>II</i>
<i>Dédicaces</i>	<i>II</i>
<i>Liste des Abréviations</i>	<i>IV</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>V</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>VII</i>
<i>Introduction</i>	<i>1</i>
<i>Synthèse bibliographique</i>	<i>3</i>
I. Généralités	3
I.1 Médicament	3
I.2 Principe actif	3
I.3 Excipients	3
I.4 Forme galénique	4
I.5 Microorganisme	4
I.6 Bactérie	4
I.7 Moisissures	5
I.8 Levures	5
II. Médicaments non obligatoirement stériles	5
III. Préparations pharmaceutiques liquides non stériles	6
III.1 Solutions buvables	6
III.2 Préparations liquides pour application cutanée :	6
III.3 Emulsions	7
III.4 Suspensions buvables	7
III.5 Sirops	8
III.6 Gouttes buvables	8
III.7 Potions	9
III.8 Préparations liquides pour instillation ou pulvérisation nasale	9
IV. Qualité microbiologique en industrie pharmaceutique	10
IV.1 Cadre réglementaire en termes de qualité	10
IV.1.1 Pharmacopée	10
IV.1.1.1 Pharmacopée européenne (Ph. Eur)	10

IV.1.1.2	Pharmacopée américaine (USP)	11
IV.1.1.3	Pharmacopée japonaise (Pmda)	11
IV.1.2	Conférence internationale pour l'harmonisation (ICH)	11
IV.1.3	Bonnes pratiques de fabrication (BPF)	12
IV.1.4	Bonnes pratiques de laboratoire (BPL)	13
IV.2	Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles	13
IV.3	Conservateurs antimicrobiens	19
IV.3.1	Méthylparabène (nipagine M)	19
IV.3.2	Propylparabène (nipasol M)	20
IV.3.3	Acide benzoïque	21
IV.3.4	Acide sorbique	22
V.	Contrôle qualité en industrie pharmaceutique	24
V.1	Contrôle qualité physico-chimique	24
V.2	Contrôle qualité microbiologique	25
V.3	Contrôle microbiologique des produits non stériles	25
V.3.1	Essais de dénombrement microbien	25
V.3.2	Recherche de microorganismes spécifiés	25
V.3.2.1	Escherichia Coli	26
V.3.3	Tests d'efficacité antimicrobienne	27
	<i>Matériels & méthodes</i>	28
I.	<i>Étude pratique</i>	28
I.1	Cadre de l'étude	28
I.2	Présentation du lieu du stage	28
I.2.1	Lieu de stage 1	28
I.2.2	Lieu de stage 2	29
I.3	Produit étudié	31
I.3.1	Produit étudié 1	31
I.3.2	Produit étudié 2	32
I.4	Analyses microbiologiques	33
I.4.1	Analyses microbiologiques du produit étudié 1	33
I.4.1.1	Matériels et équipements	33
I.4.1.2	Réactifs	33
I.4.1.3	Echantillonnage	34
I.4.1.4	Dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT)	34
I.4.1.5	Dénombrement des moisissures et levures totales (DMLT)	35
I.4.1.6	Recherche d'Escherichia Coli	35
I.4.2	Analyses microbiologiques du produit étudié 2	38
I.4.2.1	Contrôle microbiologique du produit fini	38

I.4.2.1.1 Préparation de l'échantillon _____	38
I.4.2.1.2 Méthode de filtration sur membrane _____	38
I.4.2.1.3 Recherche d'Escherichia coli _____	39
I.4.2.2 Contrôle microbiologique de l'environnement _____	41
I.4.2.2.1 Contrôle microbiologique de l'air _____	41
I.4.2.2.2 . Contrôle microbiologique des surfaces _____	43
<i>Résultats & interprétations</i> _____	44
<i>I. Résultats des analyses microbiologiques du produit étudié 1</i> _____	44
I.1 Contrôle microbiologique du produit fini Polyvitamine _____	44
I.1.1 Dénombrement des germes aérobies totaux _____	44
I.1.2 Dénombrement des moisissures et levures totales _____	44
I.1.3 Recherche d'E. Coli _____	45
<i>II. Résultats des analyses microbiologiques du produit étudié 2</i> _____	46
II.1 Contrôle microbiologique du produit fini Lactulose _____	47
II.2 Contrôle microbiologique de l'environnement _____	48
II.2.1 Contrôle microbiologique de l'air _____	48
II.2.2 Contrôle microbiologique des surfaces : _____	49
<i>Conclusion</i> _____	51
<i>Références bibliographiques</i> _____	53
<i>ANNEXE I : COMPOSITIONS DES MILIEUX DE CULTURE & ÉQUIPEMENTS UTILISES</i> _____	56
<i>ANNEXE II : DEFINITIONS LIEE A LA PARTIE PRATIQUE</i> _____	60
<i>Résumé</i> _____	65
<i>Abstract</i> _____	65
<i>ملخص</i> _____	65

Introduction

Introduction

L'industrie pharmaceutique en Algérie s'est développée progressivement au cours des dernières décennies, elle joue un rôle crucial dans la lutte contre les maladies, le développement des médicaments et des produits de santé plus performants afin de les rendre plus accessibles, efficaces et abordables pour la population, tout en réduisant la dépendance aux importations et en favorisant la production locale.

Les établissements pharmaceutiques locaux de fabrication sont régis par des réglementations strictes, supervisées par l'Agence nationale des produits pharmaceutiques (ANPP). Cette agence est responsable de la régulation, de l'enregistrement, de la surveillance et de l'inspection des entreprises pharmaceutiques, veillant ainsi à ce que les normes de la qualité et de sécurité soient respectées. [1]

Ces entreprises comprennent différents départements qui travaillent de manière synergique pour assurer le bon fonctionnement de l'ensemble du processus de développement, de production et de commercialisation des médicaments. Parmi ces départements nous nous intéressons dans ce travail au département de « contrôle de la qualité » notamment « l'unité de contrôle microbiologique » des médicaments d'une forme galénique liquide et qualifiés non stériles.

La qualité microbiologique des médicaments liquides non stériles est un aspect primordial pour assurer la sécurité et l'efficacité de ces produits. Bien que les médicaments non stériles ne soient pas exempts de micro-organismes, il est important de contrôler leur niveau de contamination microbiologique afin de minimiser les risques pour la santé des patients. Ce niveau de contamination est régi par des limites spécifiques de contamination microbienne établies par les réglementations et les normes applicables. Les limites de contamination concernent des tests microbiologiques réguliers comprennent des méthodes de dénombrement

des micro-organismes, des tests de détection spécifique d'organismes pathogènes effectués sur les préparations concernées. [2]

Dans ce travail nous sommes amenées à contrôler la qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques liquides non stériles dans le but de vérifier et approuver leur conformité.

Dans ce contexte nous avons réalisés des tests sur deux préparations pharmaceutiques liquides non stériles de deux entreprises pharmaceutiques différentes ; la solution buvable polyvitamine produit par l'entreprise pharmaceutique Sidal et le sirop Lactulose produit par EL-Kendi afin de suivre minutieusement les résultats et les interpréter d'une manière détaillée.

A travers ce mémoire, nous présentons notre travail sous forme de deux parties principales :

- ✓ Une partie théorique qui se repose sur une synthèse bibliographique comprenant des définitions et des notions importantes sur les préparations pharmaceutiques liquides non stériles et leurs qualités microbiologiques.
- ✓ Une partie expérimentale qui englobe les deux études pratiques, en mentionnant le matériel et les méthodes utilisés ainsi que les résultats obtenus.

Nous terminons par une conclusion, perspectives et recommandations.

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

I. Généralités

I.1 Médicament

Toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, et tous produits pouvant être administrés à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger, modifier ses fonctions organiques. [3]

I.2 Principe actif

Le principe actif est molécule active (en abrégé PA) destiné à exercer une action pharmacologique ou un autre effet direct en rapport avec : [2]

- Le traitement d'une maladie
- Le diagnostic d'une maladie
- La prévention d'une maladie

Un médicament peut contenir un ou plusieurs PA d'origine : [4]

- Minérale comme l'eau, le talc, les argiles bicarbonate de sodium... etc.
- Végétale comme morphine, quinine, digoxine...etc.
- Animale comme les substances extraites d'organes ou glandes fraîches remplacé par les techniques de génie génétique
- Humaine comme les médicaments dérivés du sang (albumine, facteurs de coagulation, plaquettes...etc.)
- Microbiologique comme les vaccins.

Souvent le PA seul ne peut pas être administré seul, d'où la nécessité de le mettre sous une forme compatible avec son administration et son mode d'action c'est ce qui représente la forme galénique ou forme pharmaceutique. [2]

I.3 Excipients

L'excipient est une substance inactive par elle-même sur la maladie mais qui facilite l'administration, la diffusion et la conservation du principe actif médicamenteux. On peut l'appeler aussi adjuvant ou véhicule. Il accompagne presque toujours le principe actif et est donc indispensable à la formation et la fabrication du médicament. [5]

Sa principale qualité est son inertie vis-à-vis :

- Du principe actif
- Du conditionnement
- De l'organisme

Les excipients utilisés en pharmacie sont très nombreux. Ils sont issus de plusieurs familles chimiques et selon leurs propriétés interviennent dans une forme pharmaceutique ou une autre. [6]

I.4 Forme galénique

La forme pharmaceutique (également appelée « forme médicamenteuse » ou « forme galénique ») correspond à la forme sous laquelle le médicament se présente (comprimé, gélule, sirop, collyre, crème, solution injectable, etc.). Elle est spécialement conçue pour la voie d'administration à laquelle le médicament est destiné. [7]

I.5 Microorganisme

Un micro-organisme ou microbe est un organisme vivant qui, individuellement invisible à l'œil nu, ne peut être observé qu'à l'aide d'un microscope. Ce sont tous des organismes unicellulaires.

Parmi les micro-organismes, on retrouve les bactéries, les champignons, les archéobactéries, et les protistes ; des plantes microscopiques (appelées algues vertes) ; et des animaux tel que le plancton, la planaire et l'amibe. [8]

I.6 Bactérie

La bactérie est un organisme vivant microscopique et procaryote présente dans tous les milieux. Le plus souvent unicellulaire, elle est parfois pluricellulaire (généralement filamenteuse), la plupart des espèces bactériennes ne vivant pas individuellement en suspension, mais en communautés complexes adhérant à des surfaces au sein d'un gel muqueux (biofilm). [9]

Les bactéries présentent de nombreuses formes : sphériques (coques), allongées ou en bâtonnets (bacilles) et des formes plus ou moins spiralées. L'étude des bactéries est la bactériologie, soit une des nombreuses branches de la microbiologie. [10]

I.7 Moisissures

Les moisissures sont des organismes filamenteux hétérotrophes, Certains vivent en symbiose avec les végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres sont des saprophytes, se développant sur des déchets organiques. [11]

Les moisissures sont aérobies, en général, acidophiles (pH compris entre 3 et 7) et mésophiles (température optimale 20-30°C). [12]

Cependant, certaines espèces sont psychrophiles, se développant à basse température ($T^{\circ} < 15^{\circ}\text{C}$ ou même parfois $< 0^{\circ}\text{C}$, comme *Cladosporium herbarium*, *Thamnidium elegans*). [9]

Elles ont, en générale, un faible besoin en eau par rapport à d'autres microorganismes. Elles sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytique, pectinolytique, amylolytique, protéolytique, lipolytique, etc...) qui en font des agents de dégradation dangereux mais aussi parfois des alliés utiles (affinage des fromages, production d'enzymes). [13]

I.8 Levures

Les levures sont des champignons microscopiques, unicellulaires, se multipliant par bourgeonnement (blastospores) et produisant parfois du mycélium ou du pseudomycélium. Comme tous les champignons, ce sont des organismes hétérotrophes : ils ne peuvent se développer qu'en présence de matières organiques préformées. [13]

II. Médicaments non obligatoirement stériles

Selon la pharmacopée, sur le plan microbiologique les produits pharmaceutiques peuvent être divisés en deux produits :

- Les produits qui doivent être obligatoirement stériles sont des produits "exempte de microorganismes". Le contrôle de qualité microbiologique de ces produits consiste à vérifier sa stérilité. Il existe plusieurs types de médicaments stériles, notamment les préparations à usage parentéral, ophtalmique, les pansements chirurgicaux et le matériel chirurgical. [5]
- Les produits non obligatoirement stériles qui sont Selon la pharmacopée les préparations pharmaceutiques non stériles tel que les matières premières et les médicaments à usage non parentéral. [2]

III. Préparations pharmaceutiques liquides non stériles

Selon la Ph. Eur les préparations pharmaceutiques liquides non stériles sont [14] :

- Solutions buvables
- Préparations liquides pour application cutanée
- Emulsions
- Suspensions buvables
- Sirops
- Gouttes buvables
- Potions
- Les préparations liquides pour instillation ou pulvérisation nasale [2].

III.1 Solutions buvables :

Les solutions buvables sont des préparations liquides homogènes, obtenues par dissolution d'une ou plusieurs substances médicamenteuses dans un solvant approprié. La plupart des solutions destinées à l'administration orale contiennent des aromatisants, des colorants et quelquefois des stabilisants pour conserver les propriétés chimiques et physiques des substances actives et éviter la croissance de microorganismes. Lors de la formulation, le pharmacien doit s'assurer qu'il n'y a pas d'interaction chimique entre les divers composants de la solution qui pourrait altérer la préparation. Les solutions peuvent être classées selon la nature du solvant utilisé (aqueux, alcoolique ou huileux). [5]

III.2 Préparations liquides pour application cutanée :

Les préparations liquides pour application cutanée sont des préparations de viscosité variable utilisées en vue d'une libération locale ou transdermique de substances actives. Ce sont des solutions, émulsions ou suspensions qui peuvent contenir un ou plusieurs PA dans un excipient approprié. Ces préparations peuvent également contenir des conservateurs antimicrobiens appropriés, des antioxydants et d'autres excipients tels que des stabilisants, des substances émulsionnantes et épaississantes. [4]

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des préparations liquides pour application cutanée, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournis à cet égard dans le chapitre 5.1.4 de la Ph. Eur « qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles ».

Les préparations spécifiquement destinées à être appliquées sur une peau gravement atteinte sont stériles. [2]

III.3 Emulsions :

Une émulsion est un système dispersé caractérisé par la présence d'au moins deux liquides non miscibles, dont l'un est dispersé dans l'autre. Le système obtenu est, par définition, qualifié de thermodynamiquement instable. Pourtant dans la pratique, les émulsions présentent une certaine stabilité qui peut, avec le savoir-faire du galéniste, atteindre quelques années ou tout au moins un temps compatible avec la mise sur le marché d'une forme galénique finalisée. Le terme d' « émulsion » regroupe les macro-émulsions mais également les émulsions submicroniques, les mini-émulsions et enfin les nano-émulsions, en fonction de la taille des globules qui peuvent varier d'une ou plusieurs dizaines de micromètres à une dizaine de nanomètres. [5]

III.4 Suspensions buvables :

Les suspensions sont des préparations liquides constituées par un ou plusieurs solides, de taille inférieure à 50 μm , dispersés sous forme de fines particules dans un milieu appelé « phase dispersante », externe ou continue. Celles qui sont destinées à la voie orale peuvent contenir en plus des édulcorants et des aromatisants. [15]

Si elles sédimentent, elles doivent être remises en suspension, par simple agitation ; c'est pourquoi l'étiquette comportera la mention « Agiter avant l'emploi ». [16]

Elles sont utilisées pour la voie orale soit parce que le principe actif ne peut être dissous dans l'eau, soit parce qu'un dérivé insoluble est préféré pour sa saveur moins désagréable. Des agents de suspensions peuvent être ajoutés comme des gommes, des alginates, de la méthylcellulose sodique, de la carboxyméthyl-cellulose sodique, des agents tensioactifs non ioniques...etc. [14]

III.5 Sirops :

Les sirops sont des préparations aqueuses sucrées et de consistance visqueuse. Ils sont généralement préparés avec du saccharose qui, à une concentration voisine de 65%, leur assure, en prenant un minimum de précautions, une protection antimicrobienne.

Par convention, ce n'est qu'à partir de la concentration de 45% (m/m) qu'une solution de saccharose est appelée sirop. De même, il a été admis que le saccharose pouvait être remplacé par du glucose, du fructose, du sucre inverti ou d'autres sucres et que les sirops pouvaient même être obtenus à partir de polyols de saveur sucrée (glycérol, sorbitol, xylitol ...), d'édulcorants artificiels et d'épaississants pour atteindre une viscosité voisine de celle du sirop de saccharose. [17]

Les sirops peuvent contenir un ou plusieurs PA et aussi des substances auxiliaires telles que colorants, aromatisants et agents antimicrobiens.

Certains sirops ne contiennent pas de PA, ils sont destinés à être utilisés comme véhicule dans diverses préparations pharmaceutiques et, en particulier, dans les potions. [14]

Les sirops sont dits « médicamenteux » lorsqu'ils contiennent un seul PA et « composés » lorsqu'ils contiennent plusieurs. [16]

III.6 Gouttes buvables :

Les gouttes buvables sont des solutions, des émulsions ou des suspensions administrées en petits volumes au moyen d'un dispositif approprié. [5]

III.7 Potions

Les potions sont des préparations magistrales. Ce sont des préparations aqueuses et sucrées contenant un ou plusieurs substances médicamenteuses, destinées à être prises par cuillerées. En raison de leur conservation limitée, les potions sont préparées en flacon de 150mL correspondant à 10 cuillères à soupes ou en flacon de 90 ml correspondant à 18 cuillères à café. [5]

III.8 Préparations liquides pour instillation ou pulvérisation nasale :

Les préparations liquides pour instillation ou pulvérisation nasale sont des solutions, des émulsions ou des suspensions destinées à être instillées ou pulvérisées dans les cavités nasales.

Lors de leur fabrication, leur conditionnement, leur conservation et de leur distribution, des mesures appropriés mentionnées dans le chapitre « Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutiques non stériles » de la Ph. EUR sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit. [2]

IV. Qualité microbiologique en industrie pharmaceutique :

Dans l'industrie pharmaceutique, le contrôle et l'évaluation de la qualité microbiologique sont nécessaires pour s'assurer que les médicaments sont conformes aux spécifications préétablies et n'exposent le patient à aucun risque, Ils consistent à surveiller les conditions environnementales dans lesquelles les produits sont fabriqués, inspecter les opérations et effectuer des tests tout au long de la chaîne de production jusqu'à la libération du produit fini.

IV.1 Cadre réglementaire en termes de qualité

L'industrie pharmaceutique dispose d'une réglementation stricte et rigoureuse, qui constitue un système de référence lui permettant de structurer et d'encadrer toutes les activités liées à la fabrication et la qualité de ses produits. [18]

IV.1.1 Pharmacopée

La pharmacopée est un ouvrage réglementaire, qui participe à la protection de la santé publique en élaborant des spécifications communes et reconnues relatives à la qualité des médicaments. Elle définit notamment les critères de pureté des matières premières ou des préparations entrant dans leur fabrication et décrit les méthodes d'analyse utilisées pour en assurer le contrôle. L'ensemble de ces critères est regroupé et publié sous forme de monographies régulièrement mises à jour. [5]

IV.1.1.1 Pharmacopée européenne (Ph. Eur)

La Ph. Eur est un ouvrage réglementaire destiné à être utilisé par les professionnels de santé. Elle a pour rôle de protéger la santé publique en élaborant des normes communes et reconnues régissant la qualité des médicaments et de leurs composants. Ces normes permettent d'assurer que les médicaments disponibles sur le marché sont sans danger pour les patients, il est donc vital qu'elles soient adaptées aux besoins. Par ailleurs, leur existence facilite la libre circulation des médicaments en Europe et au-delà.

Les monographies et autres textes de la Pharmacopée Européenne sont rédigés de façon à répondre aux besoins : [2]

- Des autorités réglementaires,
- Des services chargés du contrôle qualité des médicaments et de leurs constituants,
- Des fabricants de médicaments et de leurs différents composants.

IV.1.1.2 Pharmacopée américaine (USP)

United States Pharmacopeia (USP) est une pharmacopée pour les États-Unis publiée annuellement par la « United States Pharmacopeia », une organisation à but non lucratif qui est propriétaire de la marque et détient les droits d'auteur sur la pharmacopée elle-même. L'USP est publiée dans un volume combiné avec le « National Formulary » (un formulaire) comme l'USP-NF.

Les médicaments assujettis aux normes de l'USP comprennent les médicaments pour usage humain (sur ordonnance, en vente libre ou autrement) et les médicaments à usage vétérinaire. [5]

IV.1.1.3 Pharmacopée japonaise (Pmda) :

La Pharmacopée japonaise est un recueil officiel de normes et de spécifications pour les médicaments, les excipients et les produits de santé au Japon. Son objectif principal est d'assurer la qualité, l'efficacité et la sécurité des produits pharmaceutiques et de santé disponibles sur le marché japonais. Elle est utilisée comme référence standard par les fabricants de médicaments, les laboratoires d'analyse et les autorités réglementaires pour évaluer la conformité des produits aux normes de qualité requises. [19]

IV.1.2 Conférence internationale pour l'harmonisation (ICH)

L'ICH « International Conference on Harmonization » est le conseil international pour l'harmonisation des exigences techniques pour les produits pharmaceutiques à usage humain.

C'est un comité créé à l'initiative de la communauté économique européenne dans les années 80 et fonctionne sous forme de conférences en vue d'harmoniser les exigences en matière d'AMM entre les États-Unis, le Japon et l'Union Européenne.

L'objectif de l'ICH est d'atteindre une harmonisation des principes de qualité, sécurité et

efficacité des médicaments. [20]

Les lignes directrices de l'ICH (guidelines) sont :

- Ligne directrice de Qualité (guideline Quality (Q))
- Ligne directrice de Sécurité (guideline Safety (S))
- Ligne directrice d'Efficacité (guideline Efficacy (E))
- Ligne directrice Multidisciplinaires (guideline Multidisciplinary (M)).

La ligne directrice de Qualité (Q) comporte plusieurs lignes de Q1 à Q11 dont les annexes Q4B-4A(R1), Q4B-4B(R1), Q4B-4C(R1) sont le résultat du processus pour l'examen microbiologique des produits non stériles : chapitre général des essais de dénombrement microbien, chapitre général des essais pour les micro-organismes spécifiés, chapitre général des critères d'acceptation des préparations pharmaceutiques et des substances à usage pharmaceutique. [21]

IV.1.3 Bonnes pratiques de fabrication (BPF)

Les bonnes pratiques de fabrication des médicaments constituent un des éléments de l'assurance de la qualité qui garantit que les produits sont fabriqués et contrôlés de façon cohérente et selon les normes de qualité adaptées à leur emploi. Les bonnes pratiques de fabrication s'appliquent à la fois à la production et au contrôle de la qualité. [22]

Tout procédé de fabrication est clairement défini et revu systématiquement à la lumière de l'expérience ; il doit être démontré que le procédé est capable de produire de façon répétée des médicaments répondant à leurs spécifications.

Les étapes critiques de la fabrication et toutes les modifications importantes sont validées ainsi que tous les moyens nécessaires à la mise en œuvre des BPF sont fournis. [23]

IV.1.4 Bonnes pratiques de laboratoire (BPL)

Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) forment un système de garantie de qualité portant sur le mode d'organisation des études de sécurité non cliniques ayant trait à la santé humaine et à l'environnement et sur les conditions dans lesquelles ces études sont planifiées, réalisées, contrôlées, enregistrées, archivées et diffusées. Les principes relatifs aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL) qui visent à garantir la fiabilité, la conformité et la reconnaissance internationale des résultats d'une étude. Les essais couverts par les principes de BPL peuvent être des essais physico-chimiques ; études de toxicité et de mutagénicité, études écotoxicologiques...etc. [24]

IV.2 Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles

La présence de certains microorganismes dans des préparations non stériles peut réduire voire annuler l'activité thérapeutique du produit, et constitue un danger pour la santé du patient. Les fabricants sont donc tenus d'assurer une faible biocharge dans les formes pharmaceutiques finies, par la mise en œuvre des textes en vigueur sur les Bonnes Pratiques de Fabrication au cours de la fabrication, de la conservation et de la distribution des préparations pharmaceutiques. [25]

Le contrôle microbiologique des produits non stériles donne des critères d'acceptation applicables aux produits pharmaceutiques non stériles sur la base du dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) et du dénombrement des moisissures/levures totales (DMLT).

Le tableau 1 comprend une liste de microorganismes spécifiés pour lesquels sont établis des critères d'acceptation. Outre les microorganismes cités, l'importance à accorder à la présence d'autres microorganismes doit être évaluée au regard de différents facteurs :

- utilisation du produit : risque variable selon la voie d'administration (ophtalmique, nasale, respiratoire),
- nature du produit : aptitude à favoriser la croissance microbienne, propriétés antimicrobiennes adéquates,
- mode d'administration,
- catégorie de patients visée : risque potentiellement différent pour les nourrissons, les jeunes enfants, les personnes fragiles emploi d'agents immunosuppresseurs, de corticostéroïdes, existence de pathologies, de blessures, de lésions organiques. [2]

Voie d'administration	DGAT (UFC/g ou UFC/ml)	DMLT (UFC/g ou UFC/ml)	Microorganismes spécifiés
Voie orale : préparations non aqueuses	10 ³	10 ²	Absence de <i>Escherichia coli</i> (1g ou 1ml)
Voie orale : préparations aqueuses	10 ²	10	Absence de <i>Escherichia coli</i> (1g ou 1ml)
Voie rectale	10 ³	10 ²	
Voie buccale Voie gingivale Voie cutanée Voie nasale Voie auriculaire	10 ²	10	Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1g ou 1ml) Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1g ou 1ml)
Voie vaginale	10 ²	10	Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1g ou 1ml) Absence de <i>Pseudomonas</i>

			<i>aeruginosa</i> (1g ou 1ml) Absence de <i>Candida albicans</i> (1g ou 1ml)
Voie transdermique (limites pour un dispositif transdermique, film protecteur et support compris)	10 ²	10	Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1g ou 1ml) Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1g ou 1ml)
Inhalation (des exigences spécifiques s'appliquent aux préparations liquides dispensées au moyen de nébuliseurs)	10 ²	10	Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1g ou 1ml) Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1g ou 1ml) Absence de bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires (1g ou 1ml)
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	10 ⁴	10 ²	Au maximum 10 ² UFC de bactéries gram –négatives résistantes aux sels biliaires (1g ou 1ml) Absence de <i>Salmonelles</i> (10g ou 10ml) Absence d' <i>Escherichia coli</i> (1g ou 1ml)

prétraitement antimicrobien est impossible et que l'autorité compétente admet une DGAT de matières premières supérieures à 10^3 UFC/g ou UFC/ml			Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1g ou 1ml)
Disposition spéciale de la Ph. Eur pour les prémélanges pour aliments médicamenteux pour usage vétérinaire contenant des excipients d'origine végétale sur lesquels un traitement antimicrobien est impossible	10^5	10^4	Au maximum 10^4 UFC de bactéries gram –négatives résistances aux sels biliaires (1g ou 1ml) Absence d' <i>Escherichia coli</i> (1g ou 1ml) Absence de salmonelles (25mg ou 25ml)

Tableau 1 Critères d'acceptation de la qualité microbiologique des formes pharmaceutiques non stériles [2]

Le tableau présente les critères d'acceptation de la qualité microbiologique de plusieurs formes pharmaceutiques en fonction de leurs voies d'administration, les critères se résument en la limite supérieure de DGAT et DMLT et la détermination de l'absence ou la présence d'un microorganisme spécifié.

Pour le DGAT ; on constate que le nombre d'UFC ne doit pas dépasser :

- 10^2 UFC/ml ou 10^2 UFC/g pour les préparations aqueuses administrées par voie orale, préparations pour usage buccale, préparations pour usage gingivale, préparations pour usage cutané, préparations pour usage nasale, préparations pour usage auriculaire,

préparations pour usage vaginale, préparations pour usage transdermique et les préparations destinées à l'inhalation.

- 10^3 UFC/ml ou 10^3 UFC/g pour les préparations non aqueuses administrées par voie orale et les préparations pour usage rectale.
- 10^4 UFC/ml ou 10^4 UFC/g pour les préparations pour administration 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 de matières premières supérieures à 10^3 UFC/g ou UFC/ml
- 10^5 UFC/ml ou 10^5 UFC/g pour les prémélanges pour aliments médicamenteux à usage vétérinaire contenant des excipients d'origine végétale sur lesquels un traitement antimicrobien est impossible.

Pour le DMLT ; on constate que le nombre d'UFC ne doit pas dépasser :

- 10 UFC/ml ou 10UFC/g pour les préparations aqueuses administrées par voie orale, préparations pour usage buccale, préparations pour usage gingivale, préparations pour usage cutanée, préparations pour usage nasale, préparations pour usage auriculaire, préparations pour usage vaginale, préparations pour usage transdermique et les préparations destinées à l'inhalation.
- 10^2 UFC/ml ou 10^2 UFC/g pour les préparations non aqueuses administrées par voie orale, les préparations pour usage rectale et 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 de matières premières supérieures à 10^3 UFC/g ou UFC/ml

- 10^4 UFC/ml ou 10^4 UFC/g pour les prémélanges pour aliments médicamenteux pour usage vétérinaire contenant des excipients d'origine végétale sur lesquels un traitement antimicrobien est impossible.

Pour la recherche de microorganisme spécifié on constate que dans 1g ou 1ml de produit :

- L'absence d'*E. Coli* est obligatoire pour les préparations administrées par voie orale qu'elle soit solide ou liquide.
- L'absence de *Pseudomonas aeruginosa* et l'absence de *Staphylococcus aureus* est obligatoire pour les préparations à usage buccale, gingivale, cutanée, nasale, auriculaire, vaginale, transdermique et les préparations destinées à l'inhalation.
- L'absence de *Candida albicans* est obligatoire pour les préparations destinées à la voie vaginale.
- L'absence de bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires est obligatoire pour les préparations destinées à l'inhalation.
- L'absence de *Salmonelles*, *E. Coli*, *Staphylococcus aureus* et une présence limitée à 10^2 UFC de bactéries gram –négatives résistances aux sels biliaires est obligatoire 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 de matières premières supérieures à 10^3 UFC/g ou UFC/ml.
- L'absence d'*E. Coli* dans 1ml ou 1g de produit et l'absence de *salmonelles* dans 25mg ou 25ml de produit et une présence inférieure à 10^2 UFC de bactéries gram –négatives résistances aux sels biliaires dans 1ml ou 1g de produit est exigée pour les prémélanges pour aliments médicamenteux pour usage vétérinaire contenant des excipients d'origine végétale sur lesquels un traitement antimicrobien est impossible.
- Aucune exigence n'est déterminée pour la voie rectale.

IV.3 Conservateurs antimicrobiens

Les agents de conservation antimicrobienne ne doivent pas remplacer les bonnes pratiques de fabrication. L'efficacité de ces agents antimicrobiens peut être accrue ou diminuée par le composant actif de la préparation ou par la composition de la préparation. [2]

Ses agents sont des substances ajoutées aux produits pharmaceutiques pour prévenir la croissance de micro-organismes tels que les bactéries, les champignons et les levures. Ils sont utilisés pour maintenir l'intégrité et l'efficacité des produits pharmaceutiques tout au long de leur durée de conservation.

Les conservateurs antimicrobiens utilisés en pharmacie peuvent varier en fonction du type de produit et de sa formulation spécifique. [26]

Les conservateurs antimicrobiens qui rentrent dans la composition des médicaments testés sont :

IV.3.1 Méthylparabène (nipagine M) :

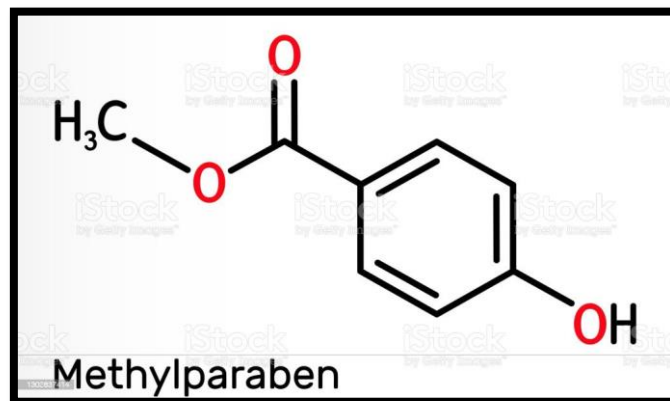


Figure 1 : formule chimique de Méthylparabène

Dénoté également « parahydroxy benzoate de méthyle » ; est un conservateur antimicrobien largement utilisé dans les produits pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques. Se présente sous forme de cristaux incolores ou des cristaux blancs poudrés. Il est inodore ou presque inodore et a un léger goût brûlant. [6]

La nipagine M est utilisée dans les solutions et les suspensions orales avec une concentration de (0.015-0.2 %) et présente une activité antimicrobienne de pH de 4 à 8. L'efficacité du conservateur diminue avec l'augmentation du pH en raison de la formation de l'anion phénolate. Les parabènes sont plus actifs contre les levures et les moisissures que contre les bactéries. Ils sont également plus actifs contre les bactéries Gram positif que contre les bactéries Gram négatif. Le Méthylparabène est le moins actif des parabènes ; L'activité peut être améliorée en utilisant des combinaisons de parabènes lorsque des effets synergiques se produisent. Par conséquent, les combinaisons méthyle-, éthyle, propylée-, et butylparabène sont souvent utilisées ensemble. D'autres excipients, comme le propylène glycol (2-5 %) ; l'alcool phényléthylique; et l'acide édétique, ont également accru l'activité. L'activité peut également être améliorée en raison des effets synergiques en utilisant des combinaisons de parabènes avec d'autres agents de conservation antimicrobiens tels que l'imidurea. [27]

IV.3.2 Propylparabène (nipasol M)

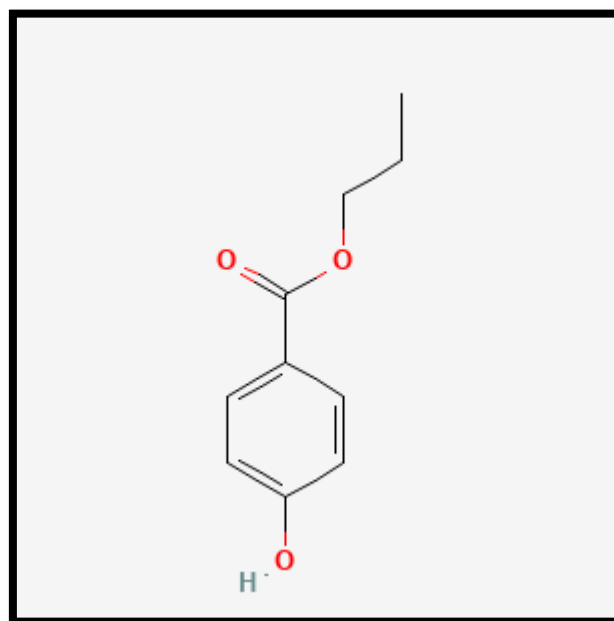


Figure 2 : formule chimique de Propylparabène

Appelé également parahydroxy benzoate de propyle, il est présent synthétiquement sous forme d'une poudre blanche, cristalline, inodore et insipide. Utilisé comme conservateur antimicrobien dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et alimentaire.

Il possède les mêmes propriétés que le Méthylparabène sauf qu'il est utilisé avec une concentration de 0.01-0.02% dans les solutions et les suspensions buvables.

L'activité des parabènes augmente avec l'augmentation de la longueur de la chaîne du groupe alkyle et en combinaison avec d'autres parabènes. [27]

IV.3.3 Acide benzoïque :

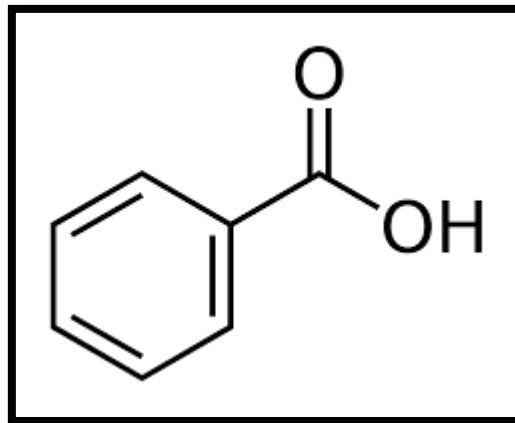


Figure 3 : formule chimique de l'acide benzoïque

L'acide benzoïque se présente sous forme de cristaux ou de poudre, plumeuse, clairs, blancs ou incolores. Il est essentiellement insipide et inodore ou avec une légère odeur caractéristique de benzoïne. C'est un agent thérapeutique et un agent de conservation antimicrobien, Actif sur les bactéries et les moisissures en état d'acide non associé ; l'activité dépend donc du pH du milieu, l'activité optimale se produit à des pH inférieurs à 4,5(à des pH supérieurs à 5, l'acide benzoïque est presque inactif). Il a été signalé que l'activité antimicrobienne est renforcée par l'ajout de protamine, une protéine basique. [6]

Il est plus actif sur les bactéries Gram positif que sur les bactéries Gram négatif et possède une activité modérée sur les moisissures qui peut accroître avec l'ajout de propylène glycol. [27]

IV.3.4 Acide sorbique

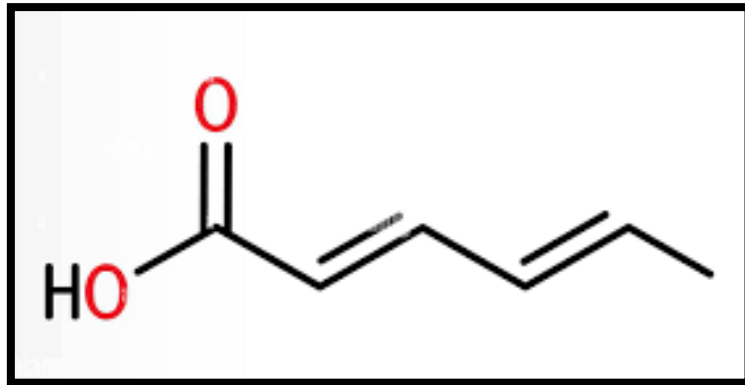


Figure 4 : formule chimique de l'acide sorbique

L'acide sorbique est une poudre cristalline insipide de blanc à blanc-jaune avec une légère odeur caractéristique, il est utilisé comme un conservateur antimicrobien pour ses propriétés antibactériennes et antifongiques utilisées dans les produits pharmaceutiques, les aliments et les cosmétiques.

En général, il est utilisé à des concentrations de 0,05 à 0,2 % dans les préparations pharmaceutiques orales et topiques, en particulier celles contenant des surfactants non ioniques. L'acide sorbique est également utilisé avec les protéines, les enzymes, la gélatine et les gencives végétales. L'activité antimicrobienne de l'acide sorbique est principalement utilisée pour ses propriétés antifongiques, bien qu'il possède également des propriétés antibactériennes, l'activité antibactérienne optimale est obtenue à un pH de 4,5; et pratiquement aucune activité n'est observée à un pH supérieur à 6. [27]

L'efficacité de l'acide sorbique est améliorée lorsqu'il est utilisé en combinaison avec d'autres agents de conservation antimicrobiens ou glycols, puisque des effets synergiques se produisent. [27]

V. Contrôle qualité en industrie pharmaceutique :

Il fait partie des BPF, concerne l'échantillonnage, l'établissement des spécifications et des tests, ainsi que l'organisation, la documentation et la mise en circulation. Il garantit que les analyses nécessaires et appropriées ont réellement été effectuées et que les matières premières ne sont pas mises en circulation en vue de leur utilisation, ni les produits finis en vue de la vente ou de la distribution, avant que leur qualité ait été jugée satisfaisante. [23]

Le contrôle de la qualité ne se limite donc pas aux activités de laboratoire, mais doit participer à toutes les décisions qui peuvent concerner la qualité du produit. L'indépendance du contrôle de la qualité par rapport à la production est un élément fondamental de son bon fonctionnement. [28]

V.1 Contrôle qualité physico-chimique

Les contrôles physico-chimiques réalisés sur un médicament permettent de vérifier la qualité pharmaceutique des médicaments mis sur le marché. Les contrôles physico-chimiques (Ph. consiste à déterminer les caractères organoleptiques des différentes formes pharmaceutiques (présentation, couleur...), identifier et doser le ou les principes actifs, déterminer la présence d'éventuelles impuretés et faire leur quantification, déterminer les caractères pharmaco techniques en relation avec la forme pharmaceutique (désintégration, dissolution, pH, ...). [2]

La qualité d'un produit pharmaceutique est assurée par le contrôle au cours de toute la chaîne de production en l'occurrence ; contrôle des matières premières (substance(s) active(s) et excipients), contrôle in-process des produits semi-finis et contrôle du produit fini. [18]

V.2 Contrôle qualité microbiologique

Les analyses microbiologiques sont indispensables pour vérifier la conformité des produits pharmaceutiques par rapport à la réglementation en vigueur. En effet, la présence de microorganismes dans le médicament peut altérer sa formule en décomposant ses ingrédients et par conséquent compromettre son efficacité. Ce type de contrôle consiste donc à rechercher les contaminations auxquelles peuvent être soumis ces produits lors de leur fabrication par identification des microorganismes et dénombrement des colonies. [30]

V.3 Contrôle microbiologique des produits non stériles :

V.3.1 Essais de dénombrement microbien

Ce sont des essais destinés à déterminer si une substance ou préparation satisfait à une spécification préétablie en matière de qualité microbiologique et permettent le dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) et le dénombrement des moisissures et levures totaux (DMLT) selon les méthodes suivantes : [2] :

- Filtration sur membrane
- Dénombrement sur plaque
 - Ensemencement en profondeur
 - Etalement en surface
- Méthode du nombre le plus probable (NPP)

V.3.2 Recherche de microorganismes spécifiés :

C'est le contrôle de l'absence ou la présence limitée de microorganismes spécifiés pouvant être décelés qui sont : [2]

- *Staphylococcus aureus*.
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Escherichia coli*.

- *Salmonella enterica*.
- *Candida albicans*.
- Les *clostridies*

V.3.2.1 *Escherichia Coli*

Escherichia coli ou colibacille est l'espèce la plus dominante de la flore intestinale de l'homme et l'animal, appartenant à la famille des entérobactéries. C'est un bacille droit à Gram négatif aérobie-anaérobie facultative avec une ciliature péritriche. Ce germe a une structure antigénique complexe repose sur des antigènes O, K, H et F qui sont qualifiés par des nombres, représentant un sérotype. [31]

Les colibacilles sont les germes les plus fréquents des infections bactériennes humaines, pouvant provoquer des infections extra intestinales comprennent les infections des voies urinaires (urétrite, cystite, pyélonéphrite), ou bien des infection intestinales qui sont causées par les pathovars EPEC, ETEC, EIEC et EHEC.

- Les EPEC (Entéro-pathogènes) provoquent des diarrhées chez les nourrissons.
- Les ETEC (Entéro-toxinogènes) sa pathogénicité repose sur les entérotoxines et ils sont responsables d'un tableau clinique choléiforme.
- Les EIEC (Entéro-invasifs) responsables d'une inflammation abcédée du gros intestin.
- Les EHEC (Entéro-hémorragiques) produisent les toxines Shiga 1 et 2 et entraînent une colite hémorragique et du syndrome hémolytique et urémique (SHU). [10]

V.3.3 Tests d'efficacité antimicrobienne

L'efficacité d'un agent de conservation antimicrobienne peut être accrue ou diminuée par le composant actif de la préparation ou par la composition de la préparation dans laquelle il est incorporé ou par le récipient et le mode de fermeture adopté. L'activité antimicrobienne de la préparation dans son récipient définitif est évaluée pour sa durée de validité, afin de s'assurer que cette activité ne se modifie pas au cours de la période de conservation. Ces examens peuvent être effectués sur des échantillons prélevés à partir du récipient définitif immédiatement avant l'essai. [2]

L'essai de l'efficacité de la conservation antimicrobienne consiste en la contamination artificielle de la préparation si possible dans son récipient définitif au moyen d'un inoculum de microorganismes appropriés prescrit au maintien de la préparation inoculée à une température prescrite au prélèvement d'échantillons à partir du récipient à intervalles de temps donnés et au dénombrement des organismes dans les échantillons ainsi prélevés. [2]

Partie expérimentale

Matériels & Méthodes

Matériels & méthodes

I. Étude pratique

I.1 Cadre de l'étude

Nous avons effectué nos stages pratiques au sein de laboratoire du contrôle de qualité « département microbiologie » à l'unité de production Saidal sise au Dar El-Beida-Alger et au sein de laboratoire de « contrôle de qualité » à l'industrie pharmaceutique el Kendi sise au Rahmania- Zeralda durant la période du mois de Mai à juin et du juin à juillet respectivement.

Notre objectif est de contrôler la conformité et la qualité microbiologique de produit fini, de maîtriser le contrôle microbiologique et de discuter les résultats de ce dernier.

I.2 Présentation du lieu du stage

I.2.1 Lieu de stage 1 :

SAIDAL est un groupe industriel spécialisé dans le développement, la production et la commercialisation des médicaments génériques en Algérie. Fondé en 1982 pour répondre au besoin d'avoir une industrie pharmaceutique locale et même de garantir la disponibilité des médicaments et améliorer l'accès des citoyens aux traitements.



Figure 5: Lieu de stage 1

Le groupe SAIDAL compte quatre filiales et neuf unités qui sont spécialisées dans la production de plusieurs médicaments de différentes classes thérapeutiques (antalgiques, anti-inflammatoires, cardiologie, gastroentérologie, métabolisme et nutrition...etc.)

Le laboratoire contrôle de qualité « microbiologie » est confectionnée selon les BPF de la manière illustrée dans la figure suivante.



Figure 6 : Présentation de département "microbiologie" de laboratoire du contrôle de la qualité de SAIDAL

I.2.2 Lieu de stage 2 :

EL-KENDI est une multinationale jordanienne, située dans la zone industrielle de Rahmania, Zeralda. C'est une usine jumelle qui est actuellement classée parmi les leaders des industriels pharmaceutiques en Algérie dans la production et le développement des médicaments génériques avec plus de 200 génériques sur le marché. La société suit le groupe pharmaceutique régional MS PHARMA qui est une plateforme lui permettant un accès rapide aux marchés voisins comme le Maroc la Tunisie et les pays africains francophones.



Figure 7: Lieu de stage 2

Le département de contrôle qualité à EL Kendi se divise en deux unités, une unité pour les analyses physiques et chimiques et une autre qui surveille la qualité microbiologique des produits, c'est laboratoire de contrôle qualité.

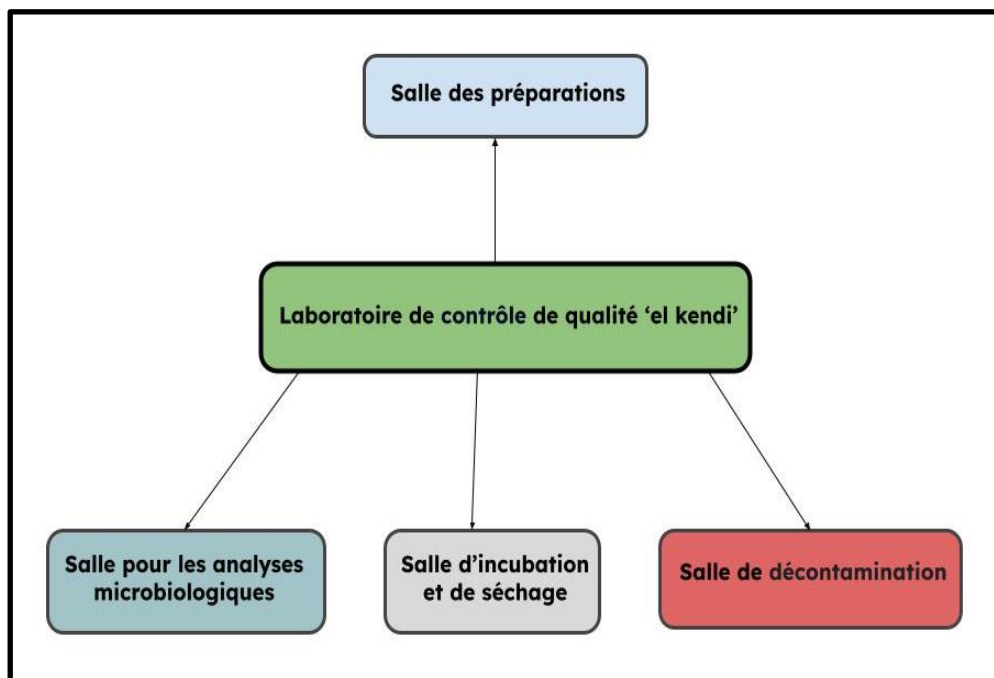


Figure 8 : Présentation du laboratoire de contrôle qualité d'EL KENDI.

I.3 Produit étudié :

I.3.1 Produit étudié 1 :

Dans le cadre de notre thème de mémoire « les préparations pharmaceutiques liquides non stériles » nous avons choisi de contrôler la préparation **VITAFORM polyvitamine** comme échantillon pour faire le contrôle microbiologique.



Figure 9: VITAFORM polyvitamine Solution buvable

Le **VITAFORM polyvitamine** est une solution buvable non stérile présentée en flacon compte-gouttes de 50 ml composé de neuve vitamine indiquée dans la prévention et la correction de troubles en rapport avec un régime alimentaire carencé ou déséquilibré.

Il est administré en raison de :

- 25 gouttes par jour pour l'adulte et l'adolescent.
- 20 gouttes par jour pour enfant de 4 à 12ans.
- 15 gouttes par jour pour l'enfant de 1à 3 ans.

Principe Actif	Excipients
<ul style="list-style-type: none"> ○ Vitamine A synthétique ○ Vitamine D3 ○ Vitamine E ○ Vitamine B1 ○ Vitamine B2 ○ Vitamine B 3(PP) ○ Vitamine B5 ○ Vitamine B6 ○ Vitamine C 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Saccharinate de sodium ○ Cyclamate de sodium ○ Acide benzoïque ○ Méthylparabène ○ Propylparabène ○ Essence d'orange douce ○ Essence d'orange deterpenée ○ Alcool éthylique 96° ○ Polysorbate 80 ○ Glycérine ○ Eau purifiée

Figure 10 : Composition de VITAFORM polyvitamine

I.3.2 Produit étudié 2 :

Le contrôle de la qualité microbiologique du produit fini a été effectué sur Ezilax® sirop (lactulose), le principe actif est le lactulose qui est un laxatif osmotique, il augmente l'hydratation et le volume du contenu colique par un effet osmotique. Il est utilisé dans le traitement symptomatique de la constipation. Son action laxative peut également être utile dans le traitement de l'encéphalopathie hépatique.



Figure 11: Ezilax Sirop

I.4 Analyses microbiologiques

I.4.1 Analyses microbiologiques du produit étudié 1 :

Selon la Ph. Eur 9^{ème} édition et les instructions internes de la société, notre analyse était faite sur des échantillons de 50ml de **VITAFORM polyvitamine** d'un lot N° 1435 avec l'utilisation d'un matériel adapté et selon un protocole prédéfini.

Nous avons fait le dénombrement des germes aérobies totaux, le dénombrement des moisissures et levures totales et la recherche D'Escherichia *Coli*.

I.4.1.1 Matériels et équipements

- ❖ Incubateur 30-35°
- ❖ Incubateur 20-25°
- ❖ Incubateur 42-44°
- ❖ Bain marie
- ❖ Boîtes de pétri de 55mm et de 90 mm de Ø stériles
- ❖ Pipettes graduées de 10 ml stériles
- ❖ Pipettes pasteur stériles
- ❖ Hotte à flux laminaire
- ❖ Rampe de filtration
- ❖ Membranes filtrantes stériles avec un diamètre des pores 0.45 µm.
- ❖ Bec bunsen
- ❖ Pince en inox
- ❖ Autoclave
- ❖ Anse à inoculer stérile

I.4.1.2 Réactifs

- ❖ Bouillon Tryptone Sel Eau (TSE)
- ❖ Tween80 (Polysorbate 80)
- ❖ Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja (TSA)
- ❖ Milieu gélosé sabouraud dextrose
- ❖ Milieu liquide aux peptones de caséine et de soja (TSB)
- ❖ Milieu liquide MacConkey
- ❖ Milieu gélosé MacConkey

1.4.1.3 Echantillonnage

Le contrôle microbiologique sur un lot de **polyvitamine** se fait sur 5 échantillons (2 échantillons pris en début de fabrication de lot ,1 échantillon pris en milieu de fabrication de lot et 2 échantillons pris en fin de fabrication de lot).

Dans des conditions d'asepsie, nous avons préparé une « solution nommée M » de 50ml à partir d'un 10ml de chaque échantillon, puis nous avons prélevé 10ml de la « solution nommée M » et la rajouter dans 90ml de la solution tampon (TSE-Tween80) donc une dilution décimale en raison de 10^{-1} .

La solution diluée « solution nommée S » doit être bien mélangée car elle sert d'un échantillon principal pour le DGAT, le DMLT et la recherche d'*Escherichia Coli*.

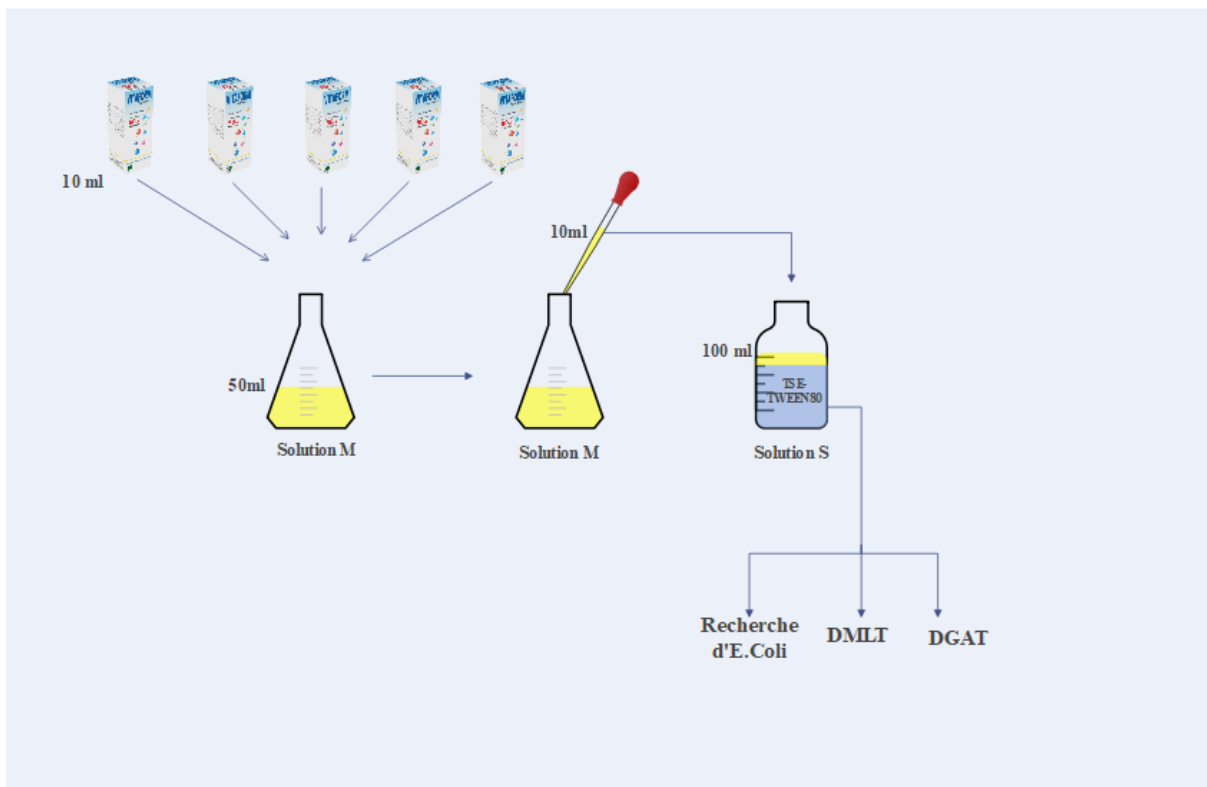


Figure 12: Schéma illustrant l'échantillonnage de VITAFORM Polyvitamine

1.4.1.4 Dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT)

Le travail est fait dans une hotte à flux laminaire aménagée d'une rampe de filtration en acier inoxydable sur une zone stérile (autour de bec bensen).

Après avoir inséré le filtre stérile de 0.45 µm sur la rampe de filtration on filtre 10 ml de la solution S diluée et on rince 3 fois avec 100ml de la solution tampon TSE-TWEEN80 pour éliminer toutes les particules qui ont un diamètre inférieur à 0.45 µm.

Le filtre sera mis sur un milieu gélosé TSA déjà liquéfié et refroidi puis sera incubé dans un incubateur à 30-35°C pendant 3jours, si y a une poussée bactérienne importante au bout de 3^{ème} jour l'incubation sera prolongée jusqu'à 5 jours.

En parallèle, nous préparons un témoin négatif composé de la solution tampon (TSE-TWEEN80) ensemencée dans un milieu gélosé TSA et incubé de la même manière que la précédente pour vérifier les conditions opératoires.

1.4.1.5 Dénombrement des moisissures et levures totales (DMLT)

La méthode choisie pour le dénombrement de moisissures et levures totales est la filtration sur membrane.

On procède de la même manière que dans le DGAT, filtrant 10 ml de la solution diluée S sur une membrane de 0.45 µm puis rinçant 3 fois avec 100 ml de la solution TSE-TWEEN80.

Le filtre sera mis sur un milieu gélosé Sabouraud dextrose et incubé dans un incubateur à 20-25°C pendant 7 jours.

Le témoin négatif composé de la solution tampon TSE-TWEEN80 et le milieu gélosé sabouraud dextrose est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon à examiner.

1.4.1.6 Recherche d'Escherichia Coli

Vu que notre échantillon est une solution buvable et la voie d'administration est orale donc selon la Ph. Eur le microorganisme recherché (contrôle qualitatif) est l'*Escherichia Coli*.

La recherche d'*E. Coli* se fait en trois étapes :

- ❖ Premièrement, 10 ml de l'échantillon S est filtré sur un filtre de 0.45 µm de la même manière que la filtration de DGAT et DMLT ensuite le filtre est déposé dans 100 ml de milieu liquide TSB et incubé dans une étuve réglée à 30-35°C pendant 24h.
- ❖ La deuxième étape consiste à mettre 1ml de l'inoculum dans 100 ml de milieu liquide MacConkey et l'incuber dans une étuve de 42-44°C pendant 48h.

- ❖ La dernière étape sert à faire un repiquage (en strie) de l'inoculum sur un milieu gélosé MacConkey et incuber cette culture dans une étuve de 30-35°C pendant 18h à 72h avec un témoin négatif qui contient de la gélose MacConkey.

Dans le cas d'apparition des colonies d'*E. Coli* de couleur rose vif à rouge ou d'autres colonies d'aspects différent, l'identification passera à la galerie biochimique API.

Toutes les cultures microbiologiques incubées sont observées et vérifiées tout au long de leurs périodes d'incubation.

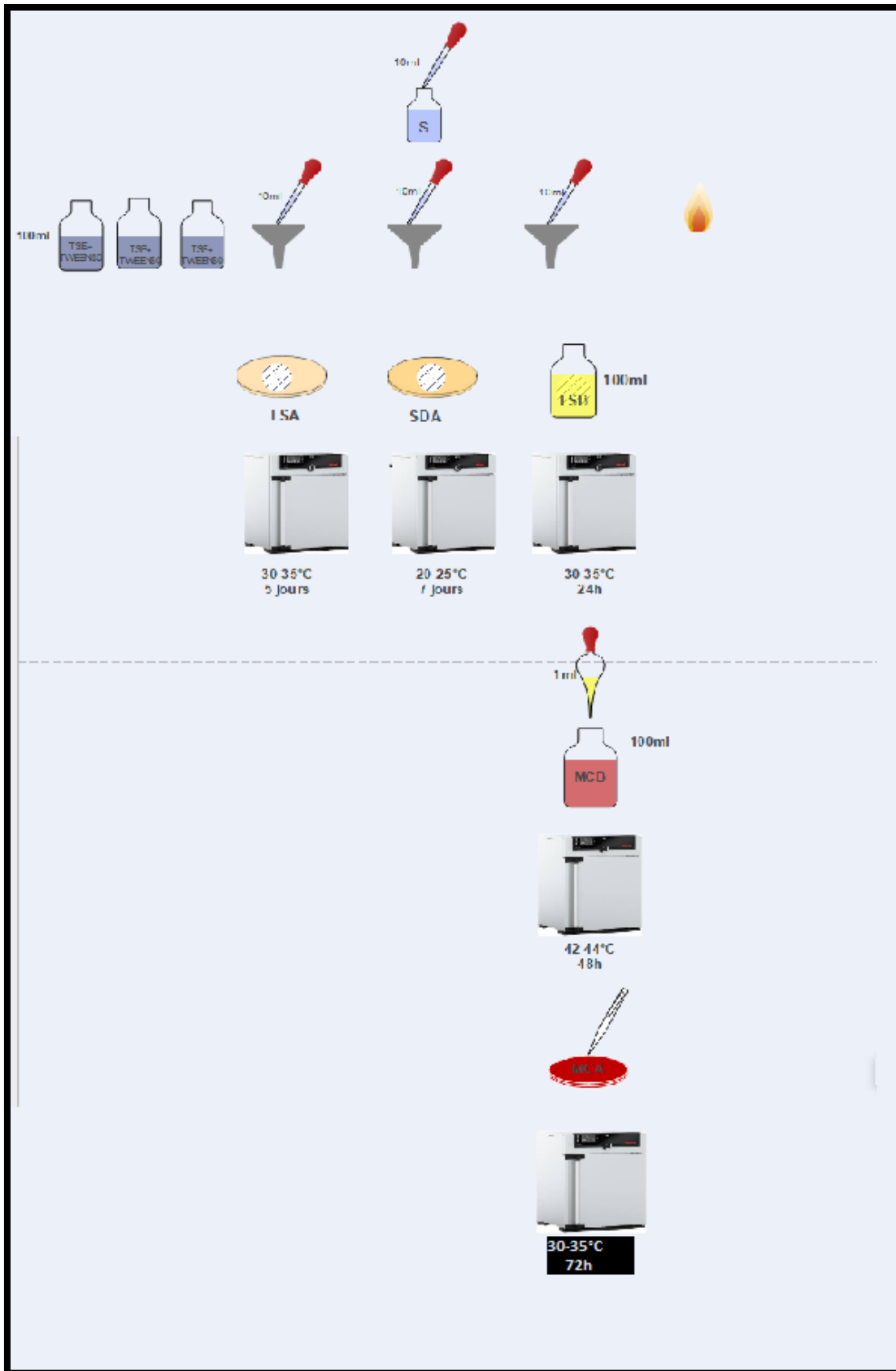


Figure 13: Schéma illustrant le contrôle microbiologique du VITAFORM Polyvitamine

I.4.2 Analyses microbiologiques du produit étudié 2 :

I.4.2.1 Contrôle microbiologique du produit fini :

I.4.2.1.1 Préparation de l'échantillon :

Dans des conditions d'asepsie, un volume de 10 ml a été prélevé à partir de trois flacons Lactulose d'un même numéro de lot et différents niveaux de production (début, milieu et fin), puis dilué dans 90 ml de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7, et Tween.

I.4.2.1.2 Méthode de filtration sur membrane

Le contrôle microbiologique d'une préparation pharmaceutique liquide se fait sur une membrane filtrante et réaliser en passant par ces étapes :

- Prélever 10 ml de l'échantillon préparé et on le filtre immédiatement sur une membrane de 0.45µm qui est posée sur un entonnoir.
- Rincer le filtre avec un volume de 50 ml pH 7 et Tween en deux fois de suite (successive)
- Récupérer la membrane filtrante et transfère la dans des milieux de culture, pour le dénombrement des germes aérobie totaux (DGAT) le transfert de la membrane sur de la gélose aux peptones de caséine et de soja (TSA) et pour le dénombrement des moisissures/levures totales (DMLT) transférer la membrane sur du milieu sabouraud dextrose-gélosé (SDA).
- Incuber les boîtes dans 30 à 35°C pendant 3-5 jours pour les germes aérobie et 20 à 25°C pendant 5-7 jours pour les moisissures et les levures.
- Effectuer un contrôle sur un témoin négatif pour une vérification des conditions opératoires, en filtrant 10ml de diluant (pH7, Tween) puis récupérer la membrane et la transférer dans des milieux de cultures pour le DGAT et le DMLT.
- Effectuer un contrôle sur un témoin négatif pour la vérification des milieux culture TSA, SDA.

Tests	Milieu de culture utilisé	Température d'incubation	Durée d'incubation
Dénombrement des germes aérobie totaux	Trypcase soja agar	30 - 35°C	3 à 5 jours

Dénombrement des moisissures et levures totales	Sabouraud dextrose gélosé	20 - 25°C	5 à 7 jours
---	---------------------------	-----------	-------------

Tableau 2 : Les germes recherchés, les milieux de culture utilisés et leurs conditions d'incubation.

I.4.2.1.3 Recherche d'*Escherichia coli* :

Pour la détection d'*E. Coli* dans le produit à analyser, on suit les étapes suivantes :

- Transférer 10ml de l'échantillon préparé et l'ensemencer dans 90 ml de milieu liquide aux peptones de caséine soja TSB puis l'incuber 30 - 35°C pendant 18 à 24h
- Après incubation, agiter l'inoculum puis transférer 1 ml dans 100 ml du bouillon MacConkey et l'incubé a 42 - 44°C pendant 24 à 48 heures.
- Sur une boîte de pétri qui contient un milieu gélosé MacConkey, ensemencer en surface un volume de 0,1 ml du bouillon MacConkey et l'incuber la boîte de gélose MacConkey à 30 - 35°C pendant 18 à 72 heures.
- *E. coli* est identifiée par la croissance des colonies rose à rouge parfois entourées d'un halo opaque qui seront confirmées par des essais d'identification biochimique.

Milieu de culture utilisé	Température d'incubation	Durée d'incubation
Bouillon Tryptone de soja (TSB)	30 - 35 °C	18 à 24 heures
Bouillon MacConkey (MCB)	42 - 44 °C	24 à 48 heures
Gélose MacConkey (MCA)	30 - 35 °C	18 à 72 heures

Tableau 3 : Les milieux de culture utilisés et leurs conditions d'incubation dans la recherche d'*Escherichia coli*.

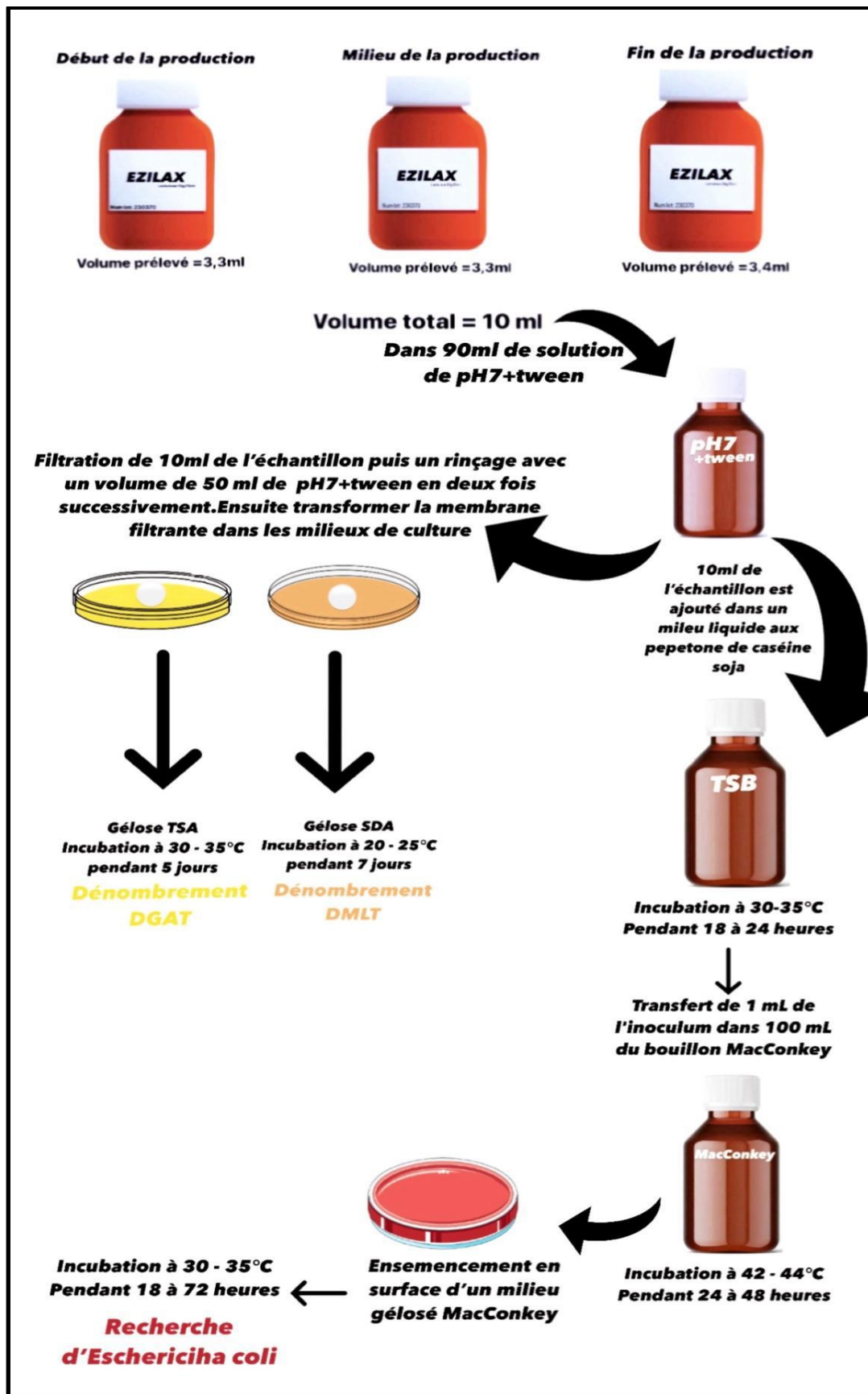


Figure 14: Le processus de contrôle microbiologique du produit fini Ezilax® sirop 10g/15ml.

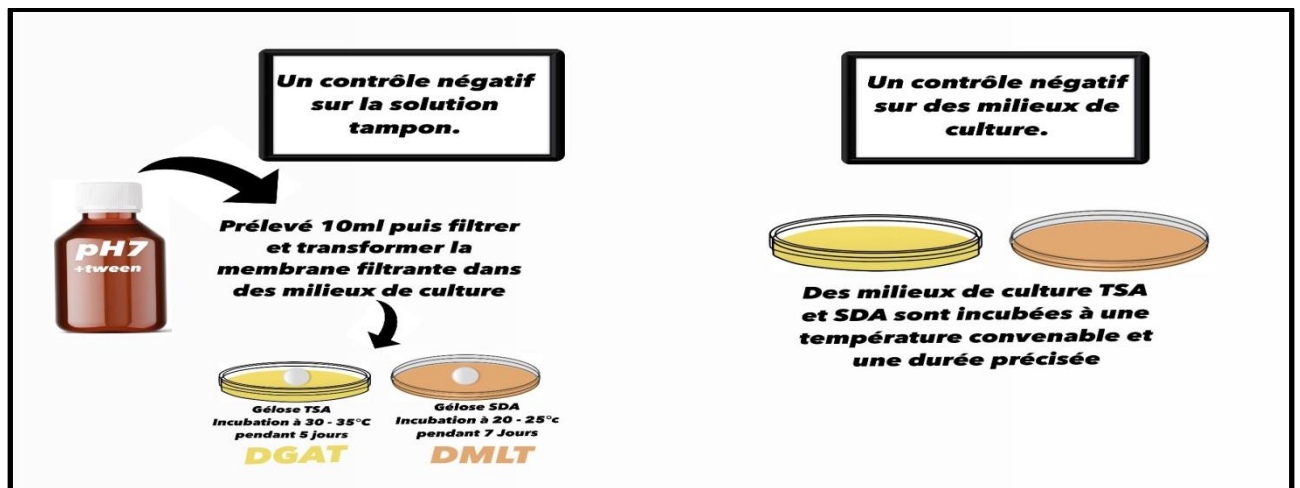


Figure 15 : Le contrôle sur des témoins négatifs pour une vérification des conditions opératoires.

I.4.2.2 Contrôle microbiologique de l'environnement

I.4.2.2.1 Contrôle microbiologique de l'air

Le prélèvement doit être effectué selon deux manières différentes :

❖ Prélèvement 1 : utilisation de RCS

Le contrôle de l'aire se fait par un système d'échantillonnage d'air microbien RCS, Cet appareil est capable de collecter en douceur mais très efficacement les microorganismes d'une capacité de 1-2000 litres. Il a des stripes d'agar spécifiques contenant le milieu nutritif Trypcase soja agar (TSA) et le milieu sabouraud dextrose agar (SDA). On l'utilise également pour contrôler l'air comprimé des machines à l'aide d'un adaptateur.



Figure 18 Adaptateur d'un préleveur d'air RCS



Figure 17 Stripes d'agar



Figure 16 Préleveur d'air RCS®

Positionner l'appareil selon le sens du flux d'air et le programmer de sorte à prélever un volume de 1 m³ par salle pour une durée d'échantillonnage qui ne dépasse pas 10 minutes. L'air prélevé sera en contact avec les stripes puis les Incuber directement avec les témoins négatifs à 30 – 35°C pendant 48 heures pour la numération des germes et des bactéries aérobies et à 20 – 25°C pendant 72 heures pour la numération des levures et moisissures.

❖ Prélèvement 2 : utilisation de boîte de sédimentation

Deux boîtes de pétris contenant un milieu gélosé, la première contient un milieu TSA et la deuxième un milieu SDA, ont a été déposées sur un support et sont en contact direct avec l'air de l'environnement pendant une durée de 4 heures puis incubé directement.

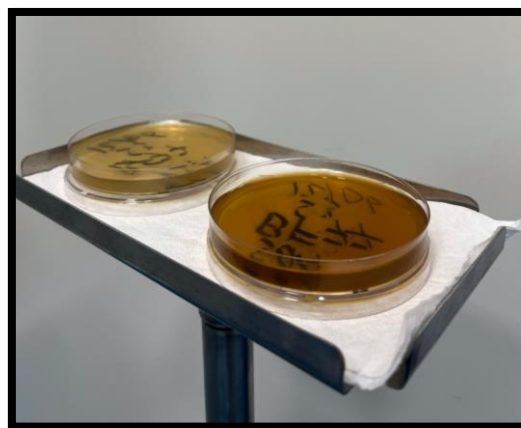


Figure 19 : sédimentation des boites de pétri

I.4.2.2.2 . Contrôle microbiologique des surfaces :

L'échantillonnage des surfaces est effectué à l'aide d'une boîte de contact de type Rodac d'une forme couvercle et qui contient un milieu de TSA et un diluant Tween de la manière suivante :

- Fixer la boîte de pétri sur la surface à examiner avec un contact total de la gélose.
- Incuber directement les boîtes ainsi un témoin négatif à 30-35°C pendant 48h.
- Nettoyer la surface échantillonnée avec un agent désinfectant afin d'enlever tous les résidus d'agar.

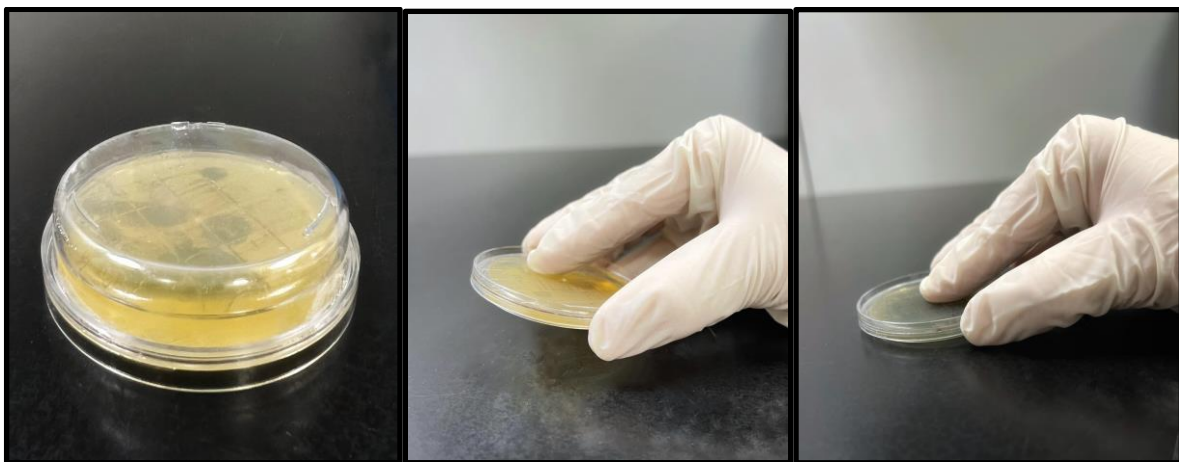


Figure 20: Contrôle microbiologique des surfaces

Résultats et interprétations

Résultats & interprétations

I. Résultats des analyses microbiologiques du produit étudié 1

I.1 Contrôle microbiologique du produit fini Polyvitamine

I.1.1 Dénombrement des germes aérobies totaux

Après une incubation de 5 jours, nous n'avons observé aucune colonie dans le milieu gélosé TSA de l'échantillon et dans le témoin négatif donc ça signifie une absence des germes aérobies totaux dans l'échantillon.

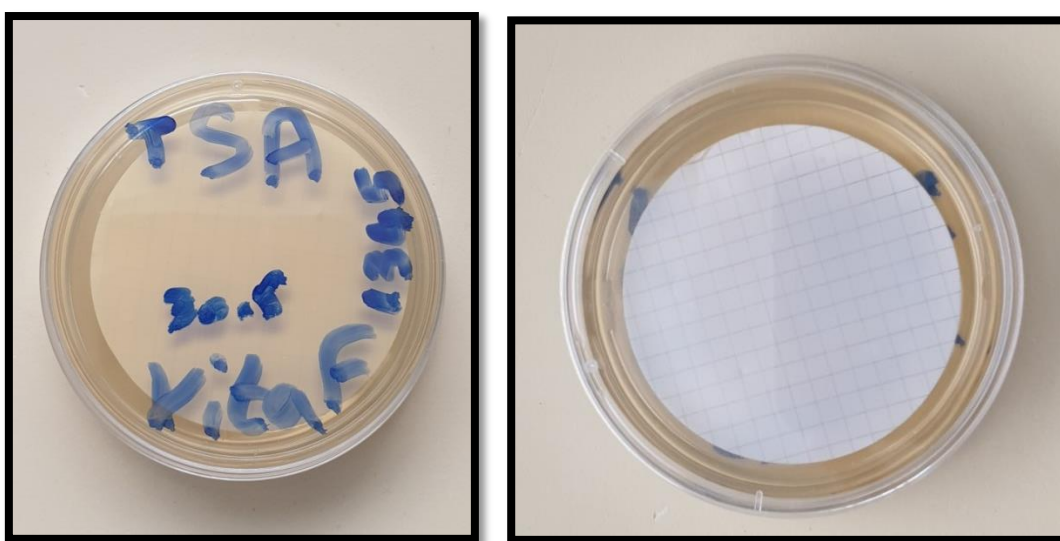


Figure 21 : Aspect macroscopique de DGAT dans le milieu gélosé TSA

I.1.2 Dénombrement des moisissures et levures totales

Après 7 jours d'incubation, nous avons observé une colonie d'aspect mousseux velouté avec une couleur blanche à l'extrémité et verte au fond dans le milieu gélosé sabouraud dextrose (SDA) de l'échantillon et une absence de colonies dans le témoin négatif ce qui oriente les résultats vers une présence d'un mycélium.

Le dénombrement est fait sur 10 ml d'échantillon donc le résultat est interprété comme suit :

$$\text{DMLT} = 0.1 \text{ UFC/ml.}$$

Cette valeur est inférieure à la valeur limite du DMLT des produits liquides non stériles indiqués dans la PH. EUR ($<10^1$ UFC/ml).

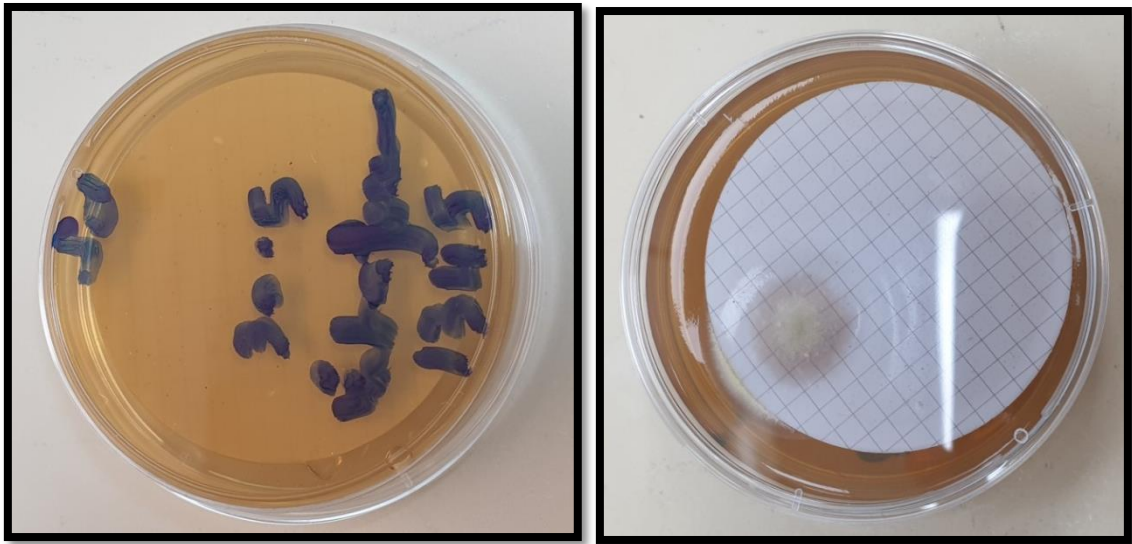


Figure 22 : Aspect macroscopique de DMLT dans le milieu gélosé sabouraud dextrose

I.1.3 Recherche d'*E. Coli*

Après une incubation des subcultures, aucune colonie n'est observée dans l'échantillon et dans le témoin négatif donc absence d'*Escherichia Coli* dans l'échantillon.



Figure 23: Aspect macroscopique des résultats de la recherche d'*E. Coli* dans la gélose MacConkey

Les résultats des contrôles microbiologiques de la solution buvable **Polyvitamine** sont récapitulés et interpréter dans le tableau suivant :

Paramètres	Résultats (UFC/ml)	Normes (UFC/ml)
Germes aérobies totaux	<10² (conforme)	<10²
Moisissures et levures totales	<10¹ (conforme)	<10¹
<i>Escherichia. Coli</i>	Absence (conforme)	Absence

Tableau 4 Résultats du contrôle de la qualité microbiologique de la solution buvable VITAFORM Polyvitamine

Les résultats de dénombrement ont révélé une absence des germes aérobies totaux et une présence non significative des moisissures et levures avec une valeur acceptable inférieure à la limite recommandée et une absence d'*Escherichia Coli* dans l'échantillon.

Ces valeurs indiquent que le produit testé **Polyvitamine** est conforme aux normes de la Pharmacopée Européenne 9^{ème} Edition et que le lot testé peut être destinée à la distribution en complétant ces contrôles avec des contrôles microbiologiques de l'environnement (surfaces, air) et des contrôles physico-chimiques de ce médicament.

La filtration dans la recherche d'*Escherichia coli* permet d'affiner la justesse des résultats et le choix de la méthode de filtration sur membrane par rapport à d'autres méthodes pour le contrôle est justifié par la nature de produit (un produit liquide) ainsi que la détermination du facteur de dilution est justifiée par rapport à la viscosité et la consistance de la solution.

II. Résultats des analyses microbiologiques du produit étudié 2

Dans cette partie, sont présentés les résultats des analyses microbiologiques obtenus qui sont comparés aux normes préconisées par la 10^{ème} Édition de la pharmacopée européenne et aux exigences internes de la société EL-Kendi.

II.1 Contrôle microbiologique du produit fini Lactulose

Les résultats du contrôle microbiologique du produit fini Lactulose sirop sont présentés dans le tableau suivant :

<i>Tests</i>	<i>Résultats (UFC/g)</i>	<i>Normes (UFC/g)</i>
Dénombrement des germes aérobies totaux	0	$\leq 10^2$
Dénombrement des moisissures et levures	0	≤ 10
Recherche d'<i>Escherichia coli</i>	Absence	Absence

Tableau 5 : Résultats de dénombrement des germes aérobies viables totaux et Levures et Moisissures

Les résultats du dénombrement montrent une absence de germes aérobies totaux, de levures et moisissures ainsi pour les germes spécifiques d'*E. Coli*. Donc selon la pharmacopée européenne de la 10ème édition, le produit fini (Lactulose sirop) est conforme.

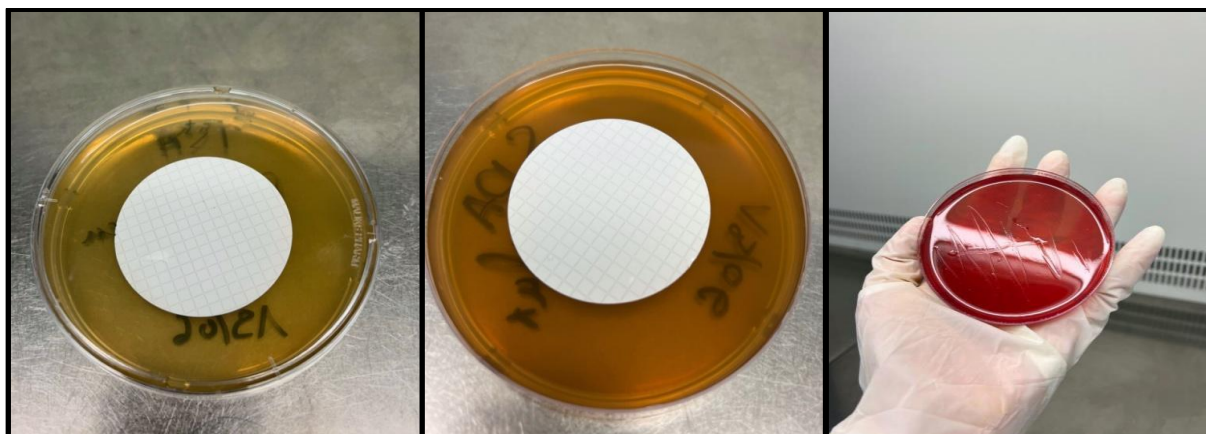


Figure 24: Les résultats du contrôle microbiologique du produit fini Lactulose® sirop sur des milieux gélosé TSA, SDA et MacConkey successivement

II.2 Contrôle microbiologique de l'environnement

II.2.1 Contrôle microbiologique de l'air

Les résultats expérimentaux de l'analyse microbiologique de l'air sont présentés dans le tableau :

Points de prélèvement	Dénombrement des germes aérobies totaux (Nombre de colonies/Boite)	Normes (UFC/m ³ d'air)
Hotte à flux laminaire	00	≤01
Salle de compression	38	≤200
Salle de granulation	28	
Salle de pelliculage	32	
Couloir	30	

Tableau 6 Résultats de contrôle microbiologique de l'air au niveau de différentes zones

Les résultats du contrôle microbiologique de l'air niveau de la zone de production et du laboratoire sont inférieurs aux limites préconisées par la 10ème Édition de la pharmacopée européenne. Ceci indique que l'environnement du travail est convenable.



Figure 25: Strip d'agar d'un contrôle microbiologique de l'air au niveau d'une salle de compression.

II.2.2 Contrôle microbiologique des surfaces :

Les résultats obtenus lors du contrôle microbiologique des surfaces sont présentés dans le tableau :

Points de prélèvement	Dénombrement des germes aérobies totaux (Nombre de colonies/Boite)	Normes (UFC/Boite)
Salle de compression	10	≤50
Salle de granulation	12	
Salle de pelliculage	09	
Couloir	16	

Tableau 7 Résultats de contrôle microbiologique des surfaces au niveau de la zone de production

Les résultats du contrôle microbiologique des surfaces au niveau de la zone de production sont inférieurs aux limites préconisées par la 10ème édition de la pharmacopée européenne. Ceci indique que l'environnement du travail est convenable.

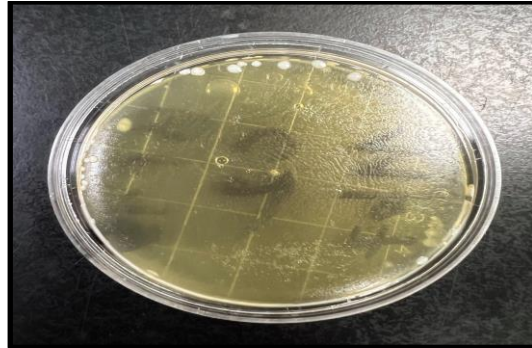


Figure 26: Résultat d'un contrôle microbiologique d'une surface au niveau du couloir de la zone de la production.

Conclusion & Recommendations

Conclusion

Nos stages au sein des laboratoires « contrôle de la qualité – contrôle microbiologique » de Sidal et EL-Kendi nous ont permis de mieux découvrir l'industrie pharmaceutique, et se révèle être une expérience dans le monde du travail très bénéfique.

En effet, ça nous a permis d'enrichir nos connaissances théoriques et pratiques dans le domaine pharmaceutique en général, d'acquérir d'autres connaissances sur le contrôle en particulier, passant du contrôle microbiologique de l'environnement jusqu'au contrôle de produit fini, ainsi d'acquérir une bonne connaissance sur l'industrie pharmaceutique comprenant la chaîne de production, les bonnes pratiques de fabrication BPF, les bonnes pratiques de laboratoire BPL et la démarche assurance qualité.

Nous avons pu développer nos connaissances pratiques en participant à la réalisation des contrôles microbiologiques de produit fini et à l'évaluation et l'interprétation de leurs résultats par rapport aux normes décrits par la pharmacopée européenne sur une solution buvable polyvitamine et un sirop Lactulose. Les résultats obtenus attestent l'innocuité microbiologique et la conformité des médicaments aux normes et attestent une bonne hygiène environnementale à travers le contrôle d'air et des surfaces.

A la lumière des résultats obtenus, quelques recommandations peuvent être proposées :

- Envisager de procéder à des tests d'efficacité de conservateurs en parallèle avec le dosage de ces conservateurs à la limite de leurs concentrations minimales.
- Adopter les méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique dites méthodes rapides qui permettent de livrer des résultats en temps réel (ou quasi réel), ouvrant la possibilité d'une action corrective plus précoce. L'exemple de l'emploi d'autofluorescence pourrait être cité pour améliorer l'efficacité des analyses.
- Etablir une procédure de validation des méthodes d'analyses microbiologiques afin de vérifier l'applicabilité de la méthode employée.
- Déployer le contrôle microbiologique sur plusieurs points en chaîne de production jusqu'à la chaîne d'approvisionnement, y compris le stockage, le transport et la distribution des produits pharmaceutiques.

- former et sensibiliser le personnel aux bonnes pratiques d'hygiène environnementale. Cela inclut la formation sur les procédures de désinfection, de manipulation des déchets, ainsi que sur les risques liés à la contamination microbienne.

Références bibliographiques

❖ Références bibliographiques

- [1] «Arrêté du 28 Dhou El Kaâda 1443 correspondant au 28 Juin 2022 fixant l'organisation interne de l'agence national des produits pharmaceutiques,» *JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 57*, p. 24, 4 Septembre 2022.
- [2] PHARMACOPÉE EUROPÉENNE, PHARMACOPÉE EUROPÉENNE, 10ème éd., Direction européenne de la qualité du médicament & soins EDQM, 2020.
- [3] R. A. D. E. POPULAIRE, «article 4 de la loi n° 08-13 du 20 juillet 2008 modifiant et complétant l'article 170 de la loi n° 85-05 du 16 février 1985 relative à la protection et à la promotion de la santé,» *JOURNAL OFFICIEL*, 2008.
- [4] A. Mangeot et J. Poisson, Notions de pharmacie galénique, Masson et Cie, 1974.
- [5] P. Wherlé, PHARMACIE GALENIQUE FORMULATION ET TECHNOLOGIE PHARMACEUTIQUE, 2ème éd., MALOINE, 2007.
- [6] O. M. Y. Koo, Pharmaceutical Excipients Properties, Functionality, and Applications in Research and Industry, Wiley, 2016.
- [7] A. n. d. médecine, «Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2023,» 2023. [En ligne]. Available: <http://www.academie-medecine.fr/>. [Accès le juin 2023].
- [8] L. Paolozzi et J.-C. Liébart, MICROBIOLOGIE Biologie des procaryotes et de leurs virus, 2ème éd., DUNOD, 2021.
- [9] L. M. Prescott, J. M. Willey, L. Sherwood et C. J. Woolverton, Microbiologie de Prescott, 5ème éd., Boeck supérieur, 2018.
- [10] F. H. Kayser, E. C. Bottger, R. M. Zinkernagel, O. Haller, J. Eckert et P. Delpazes, Manuel de poche de microbiologie médicale, Médecine- Science Flammarion, 2008.
- [11] J. Nicklin, K. Graeme-Cook, t. Paget et R. Killington, L'essentiel en microbiologie, Berti Editions, 2000.
- [12] B. Botton et J.-P. Larpent, Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle, Masson, 1990.
- [13] P. Boiron et É. Périlleux, Organisation et biologie des champignons, Nathan, 1996.
- [14] A. Le Hir, J. Chaumeil et D. Brossard, Pharmacie Galénique Bonnes pratiques de

- fabrication des médicaments, 9ème éd., MASSON, 2011.
- [15] A. K. Kulshreshtha , O. N. Singh et M. G. Wall, Pharmaceutical suspensions from formulation development to manufacturing, new york: Springer & AAPS press, 2010.
- [16] M.-j. Mathieu et J.-M. Fonteneau, le manuel porphyre du préparateur en pharmacie, porphyre, 2016.
- [17] I. v. Allen , pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems, 10ème éd., wolters kluwer, 2014.
- [18] E. Levacher, Pharmacotechnie industrielle, 2ème éd., IMT Editions, 2006.
- [19] «Pharmaceuticals and medical devices Agency,» Pmda , [En ligne]. Available: <https://www.pmda.go.jp/english/index.html>.
- [20] EDQM, «Direction européenne de la qualité du médicament & soins de santé,» conseil de l'europe, [En ligne]. Available: <https://www.edqm.eu/fr/home>. [Accès le mars 2023].
- [21] «WWW.ICH.ORG,» [En ligne]. Available: <https://www.ich.org/>. [Accès le Février 2023].
- [22] S. H. Willig et J. R. Stoker , Good manufacturing practises for pharmaceuticals A plan for total quality control, 3ème éd., Drugs and the pharmaceutical science, 1997.
- [23] organisation mondiale de la santé OMS, Guide OMS des normes relatives aux bonnes pratiques de fabrication (BPF) partie 1: modes opératoires normalisés et formules originales de fabrication, Vaccins et produits biologiques OMS, 2001.
- [24] SERIE SUR LES PRINCIPES DE BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE ET VERIFICATION DU RESPECT DE CES PRINCIPES N°1 LES PRINCIPES DE L'OCDE DE BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE, Paris: Direction de l'environnement Organisation de Coopération et de Développement Economiques, 1998.
- [25] t. Sandle , Pharmaceutical Microbiology essentials for quality assurance and quality control, Woodhead publishing series in biomedecine, 2015.
- [26] I. clontz, microbial limit and bioburden tests validation approaches and global requirements, 6ème éd., CRC Press Taylor & Francis group, 2008.
- [27] R. C. Rowe, P. J. Sheskey et M. E. Quinn, Handbook of pharmaceutical excipients, 6ème éd., pharmaceutical press APhA, 2006.
- [28] Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ansm) , Guide des bonnes pratiques de fabrication, république française : ansm , 2015-2019.

- [29] A. LESPAGNOL, A. COEUR, J. ALARY, C. LESPAGNOL, D. LESIEUR et MALANGEAU, CHIMIE DES MEDICAMENTS Tome 1, entreprise moderne d'édition -technique et documentation , 1974.
- [30] L. Jiménez, Microbial Contamination Control in the Pharmaceutical Industry, CRC Press LLC, 2019.
- [31] C. Pasquier , P. Floch et C. Chagneau , Bactériologie et virologie pratique, 4 ème éd., Boeck Supérieur, 2017.
- [32] p. beaulieu, v. pichette, j. desroches et p. souich, Précis de pharmacologie du fondamental à la clinique, 2ème éd., montréal: les presses de l'université de montréal, 2015.
- [33] j.-l. Darrigol, les vitamines, minéraux et oligoéléments, collection ABC Grancher, 2019.
- [34] B. Houssin, Vitamine D. Mode d'emploi, Thierry Souccar Éditions, 2011.
- [35] J.-C. Guillard, La vitamine D (Coll. Professions santé), Lavoisier, 2015.
- [36] G. Pacaud , Vitamines et oligo-éléments, Marabout, 2015.
- [37] H. Thiers , Les vitamines; biochimie, biologie, emploi thérapeutique, Masson, 2008.
- [38] D. Festy et A. Dufour , Guide des vitamines et des oligo-éléments, Hachette Pratique, 2005.
- [39] P. Valentin, Les Vitamines Tout Savoir Sur Les Rôles, Les Bienfaits Et Les Sources De Vitamines, CreateSpace Independent Publishing Platform, 2015.
- [40] D. Rueff , Vitamine C, Éditions Jouvence, 2013.
- [41] L. Clontz, Microbial limit and bioburden tests validation Approaches and Global Requirements, 2ème éd., CRC press Taylor & francis Group.
- [42] C. Delarras, Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de controle sanitaire, Tec & Doc Lavoisier , 2007.

Annexes

ANNEXE I : COMPOSITIONS DES MILIEUX DE CULTURE & ÉQUIPEMENTS UTILISÉS

❖ COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

MILIEU DE CULTURE	COMPOSITION (G/ML)
MILIEU TRYPTONE SEL EAU TSE	<ul style="list-style-type: none">• PEPTONE DE CASEINE ET DE SOJA 1G• CHLORURE DE SODIUM 8.5G• EAU PURIFIEE 1000ML
BOUILLON TRYPTONE -SOJA TSB	<ul style="list-style-type: none">• PEPTONE PANCREATIQUE DE CASEINE 17G• PEPTONE PAPAIQUE DE SOJA 3G• CHLORURE DE SODIUM 1G• PHOSPHATE DI POTASSIQUE 2.5G• GLUCOSE MONOHYDRATE 2.5G• EAU PURIFIEE 1000ML
GELOSE TRYPTONE SOJA TSA	<ul style="list-style-type: none">• PEPTONE PANCREATIQUE DE CASEINE 15G• PEPTONE PAPAIQUE DE SOJA 5G• CHLORURE DE SODIUM 5G• AGAR AGAR (GELOSE) 15G• EAU PURIFIEE 1000 ML
MILIEU SABOURAUD DEXTROSE GELOSE	<ul style="list-style-type: none">• DEXTROSE 40G• MELANGE DE PEPTONE PEPTIQUE DE TISSU ANIMAL ET DE PEPTONE PANCREATIQUE DE CASEINE 10G• GELOSE 15G• EAU PURIFIEE 1000ML
MILIEU LIQUIDE DE MACCONKEY	<ul style="list-style-type: none">• HYDROLYSAT PANCREATIQUE DE

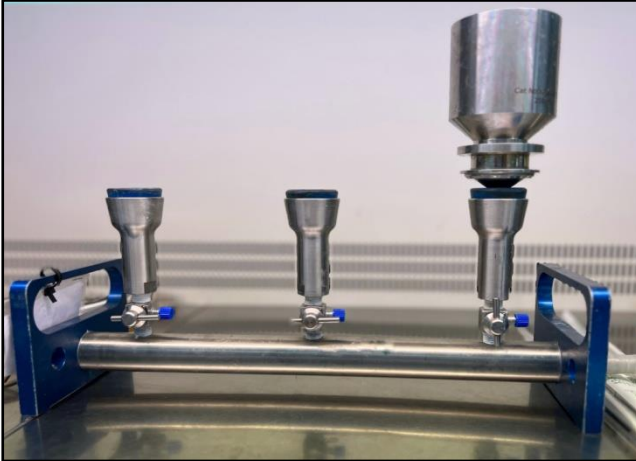
	<ul style="list-style-type: none"> GELATINE 20 G LACTOSE MONOHYDRATE 10G BILE DE BOEUF DESHYDRATEE 5G POURPRE DE BROMOCRESOL 10 MG EAU PURIFIEE 1000 ML
MILIEU GELOSE DE MACCONKEY	<ul style="list-style-type: none"> HYDROLYSAT PANCREATIQUE DE GELATINE 17G PEPTONES DE VIANDE ET DE CASEINE 3 G LACTOSE MONOHYDRATE 10G CHLORURE DE SODIUM 5 G SELS BILIAIRES 1,5 G GELOSE 13,5 G ROUGE NEUTRE 30 MG VIOLET CRISTALLISE 1 MG EAU PURIFIEE 1000 ML
MILIEU GÉLOSÉ R2A (REASONER'S 2A AGAR)	<ul style="list-style-type: none"> PROTEOSE PEPTONE 0.5G EXTRAIT DE LEVURE 0.5G HYDROLYSAT DE CASEINE 0.5G GLUCOSE 0.5G AMIDON SOLUBLE 0.5G PYRUVATE DE SODIUM 0.3G PHOSPHATE DE POTASSIUM DIBASIQUE 0.3G SULFATE DE MAGNESIUM, 7H₂O 0.05G AGAR AGAR 15G EAU PURIFIEE 1000 ML

Tableau 8 composition des milieux de culture

❖ **Appareillage et matériel utilisés pour le contrôle microbiologique**

Appareillage et Matériels

• **Rampe de filtration**



• **Compteur colonies**



• **Hotte à flux laminaire**



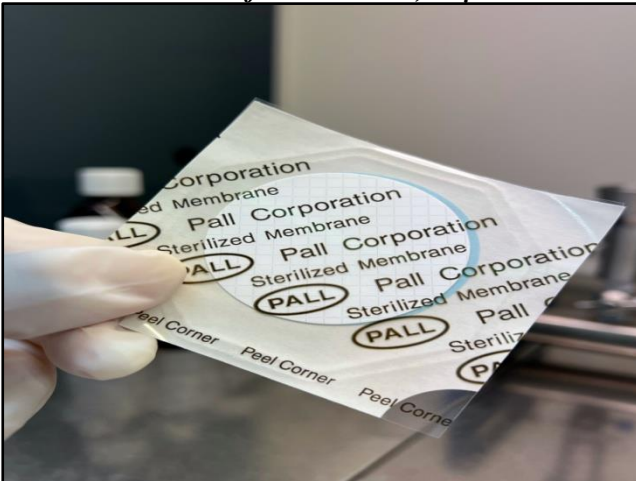
- **Incubateurs**



- **Bain marie**



- **Membrane filtrante de 0,45 µm de diamètre**



- **Gants stériles.**
- **Alcool 70°.**
- **Boîtes de pétri de 90 mm .**
- **Boite de contact de type Rodac.**
- **Flacons stériles ambre.**

- **Pince stérile.**
- **Pipettes graduées de 10 ml stériles.**
- **Anse stérile.**
- **Bec Bunsen.**

❖ **Les laxatifs osmotiques :**

Ce sont des médicaments utilisés dans le traitement de la constipation, ils sont soit des sels, des alcools ou des sucres non absorbables. Tous les laxatifs n'ont pas le même mode d'action et certains doivent être privilégiés. C'est notamment le cas des sucres non absorbables (lactulose) qui atteint le côlon sous forme inchangée pour hydrater et augmenter le volume du contenu colique en attirant l'eau dans la lumière intestinale. [32]

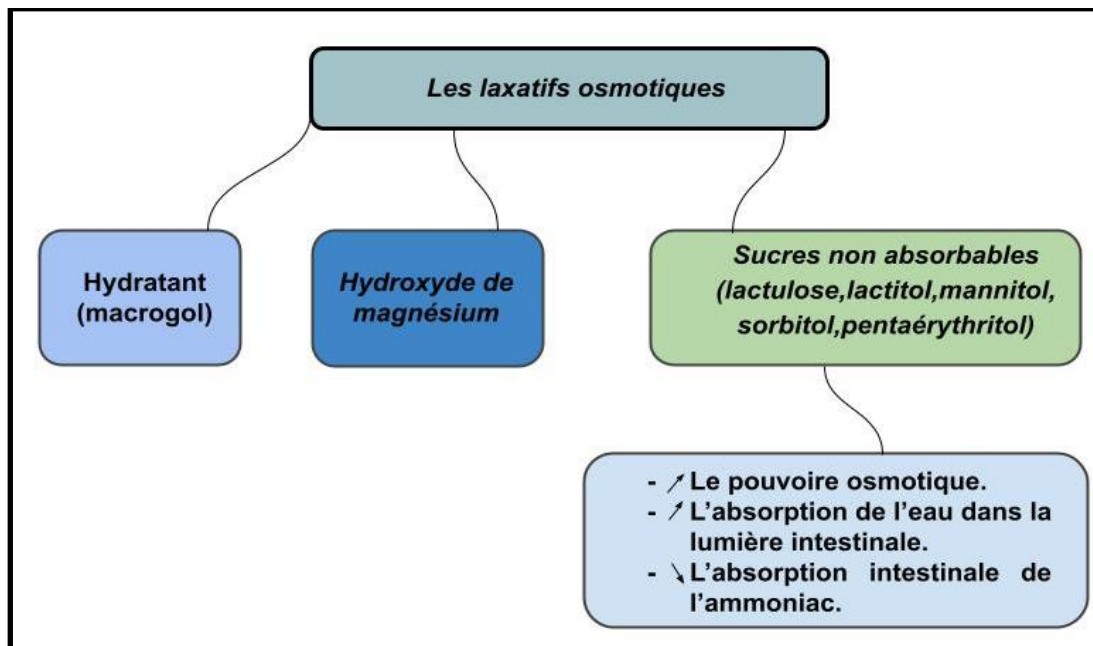


Figure 27 Mécanisme action des laxatifs osmotiques

❖ **Les vitamines :**

➤ **Vitamine A synthétique :**

Appeler également Rétinol à cause de son action bénéfique sur la rétine de l'œil. Elle est exclusivement d'origine animale, sa principale source étant le foie des poissons. C'est une vitamine liposoluble synthétisé également à partir des précurseurs d'origine végétale nommés carotènes.

Elle a une action stimulatrice sur les fonctions visuelles et une action inhibitrice sur les processus dégénératifs liées au vieillissement notamment sur la peau en s'opposant à l'action des radicaux libres.

Une carence en « vitamine A » provoque une diminution de l'acuité visuelle peut atteindre jusqu'à la cécité chez les enfants, conjonctivite, sécheresse de la cornée, retard de croissance chez les enfants, fragilité osseuse, carie dentaire et etc. [33]

➤ **Vitamine D3 :**

Le cholécalférol est une vitamine liposoluble et une hormone endogène synthétisé par le corps sous l'action des rayons UV du soleil qui agissent sur les stérols contenue dans le derme et l'hypoderme. C'est une vitamine antirachitique car elle a un rôle majeur sur la fixation du calcium sur les os, ce qui leur permet d'être solides et rigides. [34]

Elle est anti allergique et anti-infectieuse également, une carence en vitamine D provoque un ramollissement de l'os occipital, des déformations du thorax et des poignets, des fractures et des troubles de la dentition et un rachitisme chez l'enfant ainsi une ostéomalacie chez l'adulte. [35]

➤ **Vitamine E :**

La vitamine E est une vitamine liposoluble recouvrant un ensemble de huit molécules organiques, quatre tocophérols et quatre tocotriénols, La forme biologiquement la plus active est l' α -tocophérol qui se concentre principalement dans le tissu adipeux, les glandes surrénales, les testicules et l'hypophyse. [36]

Elle possède un effet antioxydant, anti-âge, et anti vieillissement. L'avitaminose E provoque un arrêt de la spermatogénèse, stérilité féminine, retard de croissance de l'enfant, anémie et d'autres lésions de la peau. [33]

➤ **Vitamine B1 (Thiamine) :**

Surnommée vitamine « anti déprime » ou vitamine « antistress » est une vitamine hydrosoluble contribue activement au métabolisme des glucides essentiel aux neurones favorisant la transmission de l'influx nerveux. D'où vient son effet efficace contre les troubles de comportement et de l'humeur. [37]

L'action de la vitamine B1 est inhibée par la nicotine et l'alcool, ceci peut avoir de lourdes conséquences chez les gros fumeurs et chez les personnes qui ont une consommation accrue en sucre. L'avitaminose B1 provoque une maladie appelée « le béribéri » ; c'est maladie qui se présente sous deux formes, une forme sèche qui se caractérise par des troubles nerveux

sévères comme la polynévrite et une forme humide qui se caractérise par un œdème générale avec une hypertrophie cardiaque et une hypertrophie hépatique. [38]

➤ **Vitamine B2 :(Riboflavine)**

Est une vitamine hydrosoluble et un cofacteur enzymatique qui facilite la synthèse de la flavine mono nucléotide (FMN) et de la flavine adénine nucléotide (FAD) essentielles à la synthèse de l'adénosine tri phosphate (ATP) ; une molécule essentielle dans le cycle de Krebs qui est l'aboutissement métabolique de l'assimilation des glucides, lipides et protéines.

Elle a aussi une fonction antioxydante, participant à l'assimilation du glutathion, ce qui lui confère une propriété anti-âge. L'avitaminose B2 a deux sortes de conséquences. D'une part un affaiblissement de l'état général, une fatigue psychique et mentale et une atrophie musculaire. D'autre part des problèmes oculaires et capillaires, ainsi que des lésions de la peau et des muqueuses. [33]

➤ **Vitamine B 3(PP) : (Niacine)**

Appelée Pellagre Preventing (PP) est une vitamine hydrosoluble, intimement associée à la vitamine B2, joue un rôle dans la production et la consommation de l'énergie par ses deux composés (l'acide nicotinique et la niacinamide) qui sont convertis lors de leur assimilation en deux formes actives (les coenzymes nicotinamide adénine di nucléotide NAD et nicotinamide adénine di nucléotide phosphate NADP). [39]

Elle favorise la respiration cellulaire et stimule la circulation sanguine centrale et périphérique, pour cela elle est vasodilatatrice et elle contribue à la régénération des épithéliums de la peau et des muqueuses.

L'avitaminose B3 provoque la pellagre, une maladie qui se manifeste par une asthénie, des maux de tête, des vertiges, des diarrhées, des érythèmes au niveau des parties de la peau exposés au soleil et des démences en stade avancé. [36]

➤ **Vitamine B5 : (l'acide pantothénique)**

C'est une vitamine hydrosoluble, elle contribue à la synthèse du coenzyme A qui est l'agent n°1 des réactions biochimiques intra cellulaires, fondamentales du métabolisme énergétique normal.

Elle contribue également à l'amélioration des capacités intellectuelles normales, à la synthèse des hormones stéroïdiennes (hormones du stress et hormones sexuelles), de la vitamine D et de certains messagers chimiques du cerveau (neurotransmetteurs), à la réduction de la fatigue et à la régénération de tissu épithélial qui stimule en particulier la croissance des cheveux et des ongles. [33]

➤ **Vitamine B6 :(Pyridoxine)**

La vitamine B6 est formée de trois composants (le pyridoxal, la pyridoxamine et le pyridoxol) qui jouent un rôle essentiel dans le métabolisme des protéines, c'est à dire leur fragmentation en acide aminés. Elle a un rôle essentielle dans la synthèse de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) qui stimule le bon fonctionnement du système nerveux central et contribue au métabolisme du glycogène, de la dopamine et la sérotonine qui contribuent à l'équilibre nerveux et à la régulation du sommeil. [38]

Elle facilite la conversion de tryptophane en prostaglandines qui intervient dans le fonctionnement utérin, la coagulation du sang et les phénomènes inflammatoires. Egalement, elle permet la synthèse de la glycine, laquelle a pour effet de réduire le taux urinaire d'acide oxalique, diminuant ainsi les risques de lithiase rénale par les oxalates.

L'avitaminose B6 possède un tableau clinique comparable à celui de l'avitaminose B3 : asthénie, troubles circulatoires périphériques, faiblesse musculaire, dépression nerveuse, problèmes intestinaux et lésions cutanées. [39]

➤ **Vitamine C :**

Est une vitamine hydrosoluble, la plus consommée par les populations et qui a de nombreuses fonctions :

- Anti oxydante, elle protège l'organisme du vieillissement.
- Immunostimulante, elle est un agent majeur de la protection contre les maladies infectieuses.
- Tonique, revitalisante, elle intervient dans la formation du collagène et des éléments structurantes de la peau, des cartilages, des vaisseaux sanguins, des os, des tendons, des ligaments.

- Elle stimule la thyroïde et les surrénales ainsi que la libération des neuromédiateurs.

Une carence totale en vitamine C provoque le scorbut qui se manifeste notamment par un syndrome hémorragique, des troubles de la cicatrisation, des signes rhumatismaux ou encore des atteintes gingivales. L'évolution peut être létale en absence de traitement.

Une carence partielle en vitamine C provoque des gingivites, des caries dentaires, une anémie, une fatigue générale, une cicatrisation lente...Etc. [40]

Résumé

L'objectif de ce travail est de vérifier la conformité des préparations pharmaceutiques liquides non stériles afin d'assurer leur effet thérapeutique et leur efficacité.

Les analyses microbiologiques sur le Vitaform® et L'Ezilax® sirop sont effectuées dans des conditions d'asepsie au niveau des deux industries pharmaceutiques Sidal et El kendi. Ces tests sont basés sur un dénombrement des germes aérobies totaux, de levures et moisissures ainsi qu'une recherche spécifique d'*Escherichia Coli*. Les résultats de ces analyses doivent être comparés aux normes recommandées par la pharmacopée européenne et aux exigences internes des deux sociétés.

La conformité des résultats des analyses microbiologiques confirme que la chaîne de production a été effectuée avec l'application des bonnes pratiques de fabrication (BPF) par de personnels qualifiés et bien formés.

Mots clés : contrôle qualité, industrie pharmaceutique, préparations pharmaceutiques liquides non stériles, contrôle microbiologique de médicaments, contrôle microbiologique en industrie pharmaceutique, contrôle microbiologique du produit fini.

Abstract

The aim of this work is to verify the conformity of non-sterile liquid preparations in order to ensure its therapeutic effect and efficacy.

Microbiological analyses of Vitaform solution and Ezilax syrup were carried out under aseptic conditions at a pharmaceutical company, Sidal and El kendi. These tests are based on the enumeration of total aerobic germs, yeasts and molds, as well as a specific search for *Escherichia Coli*. The results of these analyses must be compared with the standards recommended by the 10th edition of the European Pharmacopoeia, and with the internal requirements of both companies.

The conformity of the microbiological analysis results confirms that the production chain was carried out in compliance with Good Manufacturing Practice (GMP) by qualified and well-trained personnel.

Key words: Quality Control, pharmaceutical industry, non-sterile liquid pharmaceutical preparations, microbiological control of drugs, microbiological control in the pharmaceutical industry, microbiological control of the finished product.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو التحقق من جودة المستحضر الصيدلاني السائل الغير المعقم من أجل ضمان تأثيره العلاجي وفعالته.

التحليلات الميكروبيولوجية على فيتافورم محلول للشرب إيزيلاكس يتم إجراؤها في ظل ظروف معقمة على مستوى مصانع الأدوية صيدال والكدي. تعتمد هذه الاختبارات على عد الجراثيم اللاهوائية، والفطريات والخمائر بالإضافة إلى بحث المحدد عن الإشريكية القولونية. حيث يجب مقارنة نتائج هذه التحليلات بالمعايير الموصى بها في الإصدار العاشر من دستور الأدوية الأوروبي والشروط الداخلية للشركتين.

تؤكد مطابقة نتائج التحليلات الميكروبيولوجية أن سلسلة الإنتاج قد تم تنفيذها مع تطبيق ممارسات التصنيع الجيدة من قبل موظفين مؤهلين ومدربين جيداً.

الكلمات المفتاحية: مراقبة الجودة والنوعية، الصناعة الصيدلانية، التحضيرات الصيدلانية السائلة غير المعقمة، المراقبة الميكروبيولوجية للأدوية، المراقبة الميكروبيولوجية في المصانع الصيدلانية، المراقبة الميكروبيولوجية للمنتج النهائي.

