

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université FrèresMentouriConstantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département deBiologie Appliquée



## *Mémoire*

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Master Professionnalisant  
Filière : Sciences biologiques, Spécialité: Bioindustrie, Analyse et Contrôle

Par :CHABANE Karima  
SAHLI Saoussen

## *Thème*

**Validation d'une méthode d'analyse microbiologique  
d'un médicament. Cas de MONTELUKAST 10 mg.**

Jury d'évaluation :

Président de jury :Mr. KACEM CHAUCHE. N      U.M. Constantine 1

Rapporteur :Mme.BENCHIHEUB .M M.C.B. UFM. Constantine 1

Examineur: Mme. CHOUARFA .F M.A.A.UFM. Constantine 1

Maitre de stage : Mr. LEBSIR. N      microbiologiste. LDM group

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2017-2018

*Au terme de cette étude Nos remerciements reviennent en tout premier lieu à Dieu Le Tout Puissant qui nous a donné la force et la volonté de faire ce travail de recherche.*

*Nous tenons à remercier vivement notre encadreur Madame BENCHIHEUB Meriempour le soutien et l'aide qu'elle n'a jamais manqué de nous apporter, aussi pour ses conseils et ses orientations durant l'élaboration de ce travail.*

*Un immense remerciement à tous les membres du jury, pour avoir accepté d'évaluer le présent travail. Monsieur Mr. KACEM CHAOUACH.N d'avoir accepté de présider notre jury et également Madame CHOUARFA F. qui a bien accepté d'examiner notre travail. Qu'ils soient assurés de notre profonde reconnaissance.*

*Nous remercions l'ensemble des enseignants du Département de Biologie Appliquée de l'Université Mentouri de Constantine, plus particulièrement ceux de bioindustrie analyse et contrôle, pour leur aide bienveillante.*

*Un grand merci à Madame BENCHAIB Ferial Responsable Contrôle qualité LDM. groupe la directrice du centre et le personnel ces derniers ont été un magnifique soutien par toute l'attention et les moyens qu'ils ont mis à la disposition des étudiants pour passer un stage honorable.*

*Enfin et Plus qu'un remerciement, c'est une reconnaissance à notre guide de stage Monsieur Lebsir Noureddine pour son soutien et son aide, son attention, ses conseils et autres recommandations, Pour sa patience et ses encouragements et surtout sa patience et son accompagnement presque quotidien pour l'élaboration de ce travail.*

*Comme dans tout un travail accompli, il y a beaucoup de personnes qui participent de près ou de loin, peuvent être même avec un sourire, un encouragement et c'est à toutes ces personnes que nous exprimons toute notre reconnaissance,*

*J'ai l'honneur et le plaisir de dédier ce travail à:*

*Mes chers parents, sans votre affection, vos conseils, vos prières et vos efforts que vous avez déployés durant toute ma vie.*

*Mes sœurs : Samia, Leila, Fatima.*

*Mes frères : Hichem, Ibrahim.*

*Mes chers petits : Djana, MohamedTaha ; Rimasse.*

*Mes amies : Amira, Omayma, Nihad, Karima Khawla, Hadia, Zahra, Maroua, Khadîdja sur lesquelles je peux toujours compter .*

*Toute ma famille*

*Tous les collègues de ma promotion.*

*A Mr. lebsir Noureddine mon guide de stage*

*Tous ceux qui m'ont aidée et encouragée*

**SAOUSSEN**

*Je dédie ce modeste travail particulièrement à mes très chers parents*

*Pour tout ce qu'ils ont fait pour que je puisse arriver à ce stade. Ma mère qui m'a encouragé pendant toutes mes études*

*Mon père, qui est toujours disponible pour nous, et prêt à nous aider.*

*Ames sept merveilleuses sœurs.*

*A mes frères :Redouan et Mohamed Amine.*

*A ma chère petite: AYA CELIA.*

*A mes amies :Basma ,Wafa, Monira, Ghozlan, khadidja, Zahra, Maroua ,Hadia, Nassima qui sont la source de ma confiance*

*A tous ma famille.*

*A tous les collègues de ma promotion de bioindustrie analyse et contrôles et ceux de la promotion de biochimie en faculté de Skikda.*

*A Mr.lebsir Nouredine mon guide de stage*

*A mon fiancée Aissa qui m'a toujours présent pour m'aider, je profite l'occasion pour lui dire merci d'être présent dans ma vie et ici aujourd'hui pour me partager cette joie.*

*A ma chère amie etbinômeSaoussen , pour sa patienceet sa conscience. Le travail avec toi été une merveilleuse expérience et restera une belle souvenir.*

*Tous ceux qui m'ont aidée à réaliser ce mémoire.*

**KARIMA**

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : critères d'acceptation de la qualité microbiologique des formes pharmaceutiques non stériles	27
<b>Tableau2</b> : préparation et emploi des microorganismes de références	30
<b>Tableau3</b> : Fertilité, propriétés inhibitrice et propriétés indicatives des milieux	33
<b>Tableau4</b> : agents usuels de neutralisation des substances interférentes	36
<b>Tableau 5</b> : les lots à étudier et leurs DDP et DDF	39
<b>Tableau6</b> : les milieux de cultures utilisées lors de la validation et leur numéro de lot, DDF et DDP	40
<b>Tableau 7</b> : spécifications techniques microbiologiques et les milieux de cultures utilisé	41
<b>Tableau 8</b> : résultats de calibrages des souches de références	45
<b>Tableau9</b> : résultats du Dénombrement des Germe Aérobie Viable Totaux en utilisant le TSE	45
<b>Tableau 10</b> : résultats du dénombrement des germes aérobies viables totaux en utilisant le TSE+ thiosulfate	46
<b>Tableau 11</b> : résultats du dénombrement des Germes Aérobie Viables Totaux en utilisant TSE + tween	47
<b>Tableau 12</b> : résultats du dénombrement des Germes Aérobie Viables Totaux en utilisant TSE+ 3% Tween + 0,3 % lécithine	47
<b>Tableau 13</b> : résultats du dénombrement des moisissures et levures totaux en utilisant TSE+ 3% Tween + 0,3 % lécithine	48
<b>Tableau 14</b> : résultats du dénombrement d'Escherichia coli en utilisant TSE+ 3% Tween + 0,3 % lécithine	48
<b>Tableau 15</b> : résultats du dénombrement des germes aérobies viables totaux pour l'essai (E)	49
<b>Tableau16</b> : résultats du dénombrement des levures et moisissures totaux pour l'essai (E)	49
<b>Tableau 17</b> : résultats du dénombrement des Germes Aérobie Viables Totaux pour le premier lot	50
<b>Tableau 18</b> : résultats du dénombrement des Levures et Moisissures Totales pour le premier lot	51
<b>Tableau19</b> : résultats de la recherche d'E. Coli pour le premier lot	51
<b>Tableau 20</b> : résultats de dénombrement des Germes Aérobie Viables Totaux pour le	52

deuxième lot

**Tableau 21** : résultats du dénombrement des Levures et Moisissures Totales pour le 53

deuxième lot

**Tableau 22** : résultats de la recherche d'E. Coli pour le deuxième lot 53

**Tableau 23** : résultats du dénombrement des Germes Aérobie Viabes Totaux pour le 54

troisième lot

**Tableau 24** : résultats du dénombrement des Levures et Moisissures Totales pour le 55

troisième lot

**Tableau 25** : résultats de la recherche d'E. Coli pour le troisième lot 55

## Liste des figures

Figure 1: Mise en forme d'un médicament	3
Figure 2: la structure chimique d'une molécule de MONTELUKAST sodique	7
Figure 3 : MONTELUKAST LDM 10mg avant conditionnement	8
Figure 4: Structure de la validation	21

## Les abréviations

<b>AFNOR :</b>	Association Française de Normalisation
<b>ANMS :</b>	agence national de sécurité du médicament et des produits de santé
<b>AQ :</b>	assurance qualité
<b>BPF :</b>	bonne pratique de fabrication
<b>C :</b>	Contrôle (produit plus contamination artificielle)
<b>CQ :</b>	contrôle qualité
<b>cGMP :</b>	current good manufacturing practise
<b>DCI :</b>	dénomination commercial international
<b>DDF :</b>	date de fabrication
<b>DDP :</b>	date de péremption
<b>DGAT :</b>	Dénombrement des Germes Aérobie Mésophiles Viables Totaux
<b>DMLT :</b>	Dénombrement des Leveurs et des Moisissures Totales
<b>E :</b>	Essai
<b>FDA :</b>	food and drug administration
<b>GN :</b>	gélose nutritif
<b>MP :</b>	matière première
<b>NPP :</b>	nombre le plus probable
<b>PA :</b>	principe actif
<b>PF :</b>	produit fini
<b>PI :</b>	produit initial
<b>Ph. EUR :</b>	pharmacopée européenne
<b>ICH :</b>	international conférence on harmonisation
<b>MCA :</b>	MacConKey Ager
<b>MCB :</b>	MacConKey Bouillon
<b>ISO :</b>	Organisation Internationale de Normalisation
<b>OMS :</b>	organisation mondiale de sante
<b>Qté :</b>	quantité
<b>QC :</b>	qualification de conception
<b>QI :</b>	qualification d'installation
<b>QO :</b>	qualification opérationnelle
<b>QP :</b>	qualification de performance
<b>SDA :</b>	Milieu Sabouraud Dextrosé gélosé

**SFSTP :** société française de science technique et pharmaceutique  
**T :** Témoin  
**TSA :** Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja  
**TSB :** Milieu liquide aux peptones de caséine et de soja  
**TSE :** Solution tampon péptonée au Chlorure de sodium  
**UFC :** Unité Format Colonies

## SOMMAIRE

Remerciements

Dédicace

Liste des tableaux

Listes des figures

Liste des abréviations

Sommaire

Introduction..... 1

CHAPITRE I : revue bibliographique.....

PARTIE1: généralité sur le médicament et présentation de  
MONTELUKAST 10mg

1. Généralités sur les médicaments..... 3

1.1.Définition d'un médicament..... 3

1.2. Composition d'un médicament..... 3

1.3. Origines des médicaments..... 4

1.4. Dénomination des médicaments..... 5

1.5. Fonctions du médicament..... 5

1.5.1. Fonction thérapeutique..... 5

1.5.2. Fonction diagnostique..... 6

1.6. Classification d'un médicament..... 6

1.7. Différentes formes pharmaceutiques (galéniques) des médicaments..... 6

2. Présentation de MONTELUKAST10mg..... 6

2.1. Description de MONTELUKAST 10 mg..... 6

2.2. conteneur de MONTELUKAST 10 mg..... 7

2.3 Effets indésirables éventuels..... 7

PARTIE 2 : Contrôle qualité d'un médicament

1. Contamination..... 9

1.1 Types de contamination..... 9

1.1.1 Contaminants particuliers..... 9

1.1.2 Contaminants chimiques..... 9

1.1.3 Contaminants microbiologiques..... 10

1.1.4 Contamination croisée..... 10

1.2 Sources des contaminations..... 11

<b>2. Qualité.....</b>	<b>11</b>
2.1 Définition de la qualité.....	11
2.2 La qualité en industrie pharmaceutique.....	11
<b>3. Contrôle qualité.....</b>	<b>12</b>
3.1 Définition.....	12
3.2 But du contrôle de la qualité.....	12
3.3 Contrôle de qualité d'un médicament.....	13
<b>PARTIE 3 : la validation</b>	
<b>1. Définition de la validation.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Types de validation.....</b>	<b>15</b>
2.1 Validation des matières premières.....	15
2.2 Validation des équipements.....	15
2.3 Validation des procédés de nettoyage.....	16
2.4 Validation de la durée de stockage.....	16
2.5 Validation des méthodes de prélèvement.....	17
2.6 Validation du procédé.....	17
2.7 Validation analytique.....	17
2.7.1 Définition de la validation analytique.....	17
2.7.2 Réglementation de la validation analytique.....	18
2.7.3 but de validation.....	19
2.7.4 Structure de la validation analytique.....	20
2.7.5 Processus de validation.....	21
2.7.6 revalidation .....	22
2.7.7 Critères de la validation analytique.....	22
<b>3. Validation microbiologique.....</b>	<b>24</b>
3.1 Echantillonnage.....	25
3.2. Examen de l'échantillon.....	25
3.3. Les paramètres de recherche selon la Pharmacopée Européenne.....	27
3.3.1. DGAT (Dénombrement des Germe Aérobie Mésophile Viables Totaux) et DMLT (Dénombrement des Levures et des Moisissures Totales)	27
3.3.2. Escherichia coli.....	29
3.4. Applicabilité des méthodes.....	29
3.4.1. Fertilité des milieux, paramètres d'analyse et souches de référence....	30

3.4.1.1. Pour les DGAT et DMLT.....	30
3.4.1.2. Fertilité et propriétés inhibitrices des milieux, applicabilité de la méthode d'essai pour la recherche des microorganismes spécifiés.....	33
3.5. Contrôle des produits.....	34
3.6. Neutralisation/élimination de l'activité antimicrobienne.....	35

## CHAPITRE2 : Matériel et Méthodes

1. Présentation de la société de stage.....	38
2. Champs d'application.....	38
3. Référence.....	38
4. Produit à étudier.....	38
5. Matériels et équipements.....	39
6. Réactifs et milieux de culture.....	39
7. Types de recherches à effectuer et souches de références utilisées.....	40
8. Paramètres de validation.....	41
9. Paramètres de recherches.....	41
10. Les étapes de neutralisation de MONNTELUKAST 10 mg.....	42
11. Prise d'essai.....	42
12. Calibration de la charge microbienne de chaque souche de référence.....	42
13. Préparation de l'échantillon.....	44

## CHAPITRE3 : résultats et discussion

1. Choix du diluant.....	45
1.1 Dénombrement des Germe Aérobie Viable Totaux.....	45
1.2 Dénombrement des moisissures et levures totaux.....	48
1.3 Recherche d'E. coli.....	49
2. Validation microbiologique des trois lots de médicament.....	49
2.1 Validation du premier lot.....	49
2.2 Validation du deuxième lot.....	52
2.3 Validation du troisième lot.....	53

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## ANNEXES

### Abstract

### الملخص

## **RESUME**

# **Introduction**

Lorsqu'un médicament est prescrit à un patient, l'objectif est de traiter ou de prévenir une maladie, un état pathologique, grâce à un produit efficace, sûr et de bonne qualité. Cependant, la plus part des patients n'imaginent pas tout ce qui est mis en place, en amont, par les industriels, pour atteindre cette qualité. En effet, une attention particulière est apportée à un certain nombre d'éléments tels que la sélection des constituants de bonne qualité, la conception du produit et du procédé, la validation et le contrôle des procédés, les contrôles en cours de fabrication, l'analyse du produit fini, etc.

Plus particulièrement, la validation des procédés de fabrication constitue une des étapes cruciales et indispensables à l'obtention de médicaments de qualité, efficace et sûr. En effet, il s'agit d'un des principaux outils de l'assurance qualité permettant de construire la qualité du produit et d'en conserver les caractéristiques depuis la conception jusqu'à la fin de la commercialisation. Mais ce n'est pas uniquement un outil, c'est aussi une exigence réglementaire. Depuis une trentaine d'années, les instances réglementaires ont fait paraître des directives concernant la validation, afin de guider les industriels dans cette étape importante. Dans un même temps, les industriels ont pris conscience de l'apport de la validation, en termes de qualité, et ont développé des vastes et coûteux programmes pour atteindre leur objectif. (CLEMENCE.T.2014)

La qualité des médicaments est un des principaux soucis des professionnels des services de santé et des patients, elle se définit par la maîtrise d'ensemble de paramètres et propriétés qui permet d'assurer la sécurité des patients, et amener le médicament à un niveau des exigences satisfaisantes, afin d'atteindre cette qualité il faut évaluer le risque microbiologique lié à la présence de pathogènes dans les médicaments, ceci constitue un grand risque pour les patients et un défi pour les responsables de la sécurité sanitaire. (BENATTIA.K.2012)

Ce travail a été réalisé dans le cadre de la validation microbiologique d'une méthode d'analyse d'un médicament qui est MONTELUKAST \*10mg, dont la partie revue bibliographique contient trois parties : la première partie présente une généralité sur le médicament et la présentation de MONTELUKAST 10 mg ; la seconde est consacrée au contrôle de la qualité et une troisième partie pour la validation microbiologique et ses critères.

En outre, nous abordons dans le chapitre matériels et méthodes les aspects relatifs à la validation microbiologique de MONTELUKAST\*10mg.

Enfin nous terminons par le chapitre résultats obtenus ainsi qu'une conclusion où nous montrons les apports de ce travail.

**Chapitre I :**

**Revue**

**Bibliographique**

# Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

## Partie 1: Présentation de MONTELUKAST 10mg

### 1. Généralités sur les médicaments

#### 1.1. Définition d'un médicament

Un médicament est défini d'une façon très large comme une substance chimique qui affecte les processus de la vie.

L'OMS donne une définition plus restrictive : « Toute substance ou produit qui est utilisé pour modifier ou explorer les systèmes physiologiques ou les états pathologiques pour le bénéfice de celui qui reçoit la substance » (Helali, 1994).

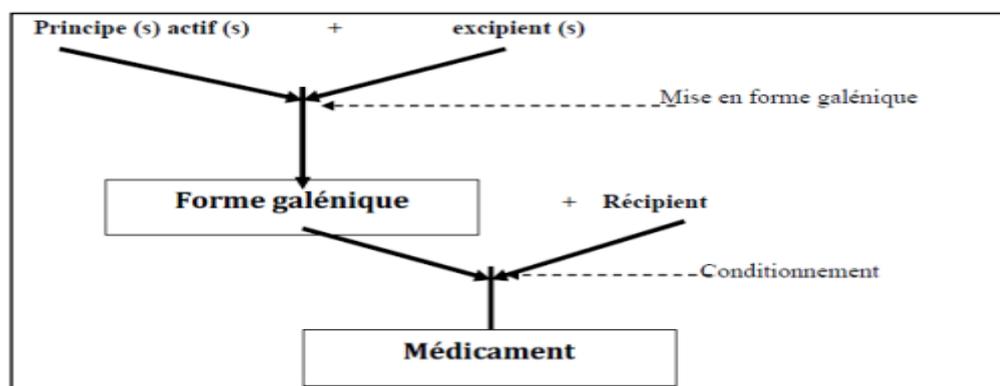
#### 1.2. Composition d'un médicament

Tout médicament est composé de deux éléments :

- **Principe actif** : c'est la molécule active détenant les propriétés curatives ou préventives,
- **Excipient** : c'est une substance inactive par elle-même, dont l'intérêt est de faciliter l'utilisation du médicament, et notamment sa libération.

Ainsi, dans un comprimé de 500 mg d'aspirine, on trouvera 500 mg d'acide acétylsalicylique, qui est le PA, et une quantité d'amidon (QSP), par exemple, qui constitue l'excipient (**Anonyme 1**).

- **Réceptacle** : il est destiné au conditionnement le protégeant ainsi de l'environnement extérieur. L'ensemble est regroupé dans un emballage accompagné d'une notice explicative (Talbert et al, 2001).



**Figure 1:** Mise en forme d'un médicament (Talbert et al, 2001).

# Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

## 1.3. Origines des médicaments

Les médicaments peuvent être obtenus de sources très diverses :

- **Origine végétale**

C'est la source la plus ancienne, mais qui reste d'actualité. Il est classique de distinguer parmi les produits végétaux :

- Les alcaloïdes : tels que la quinine, strychnine morphine ;
- Les gommes : tels que les gommes pour suspension (arabique, adragante) ;
- Les glycosides : ils contiennent des sucres dans leurs structures chimiques, tels que la digitoxine.

- **Origine animale**

- Extraits de sang humain tel que le fibrinogène ;
- Hormones polypeptidiques extractives tel que l'insuline ;
- Enzymes : tels que la trypsine, chymotrypsine. et les kinases ;

Ils existent des excipients pharmaceutiques tels que la lanoline.

- **Origine synthétique**

La plupart des médicaments actuellement commercialisés sont d'origine synthétique, obtenus par :

- Synthèse totale ;
- Héli-synthèses : tels que certaines pénicillines.

- **Origine biogénétique**

Les méthodes de génie génétiques sont les dernières venues parmi les méthodes d'obtention des médicaments : elles permettent de fabriquer par les cellules vivantes - procaryotes ou eucaryotes - des substances naturelles polypeptidiques présentant toutes les caractéristiques de leur modèle humain.

La production de masse de ces protéines parfaitement définies a permis d'obtenir de nouveaux médicaments :

- Hormones ;
- Facteurs de croissances (Moulin et Coqurel, 2002).

# Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

## 1.4. Dénomination des médicaments

Un même médicament peut avoir plusieurs noms différents :

- **Nom chimique**

Ce nom correspond à la formule chimique du PA, n'apparaît pas sur le conditionnement du médicament.

- **Dénomination Commune Internationale (DCI)**

C'est le nom admis pour tous les pays, et il est enregistré par l'OMS. La DCI est celle qu'il faudra retenir de préférence, afin de pouvoir se retrouver parmi les nombreuses marques du même médicament.

- **Nom commercial, ou nom protégé**

C'est le nom sous lequel une firme pharmaceutique vend un médicament donné. Etant donné qu'elle dépense un certain budget pour la publicité autour de ce nom, ce nom sera protégé par un brevet, dont la durée est variable suivant les pays (de 10 à 99 ans), il y a par exemple près de 400 noms différents protégés de composés contenant de l'aspirine dans certains pays (Helali, 1994).

## 1.5. Fonctions du médicament

Un médicament peut exercer des fonctions diverses :

### 1.5.1. Fonction thérapeutique

C'est la plus habituelle, elle peut être :

- **Préventive**

- Individuelle (vaccination, prévention individuelle du paludisme, chimio-prophylaxies diverses) ;
- Collective (chimio-prophylaxies collectives de la méningite, de la tuberculose).

- **Curative**

- Etiologique : le médicament s'attaque à la cause de la maladie ;
- Substitutive : il apporte l'élément manquant à l'organisme ;

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

- Symptomatique : il s'attaque seulement aux manifestations de la maladie, sans pouvoir en traiter la cause.

### 1.5.2. Fonction diagnostique

Il peut agir d'opacifiant, de traceurs, d'agents pharmacodynamiques divers, utilisés pour réaliser des explorations fonctionnelles (**Moulin et Coqurel, 2002**).

### 1.6. Classification des médicaments

On peut définir les classes des médicaments de différentes manières : classes selon leurs origines, leurs compositions ou leurs structures chimiques, classes pharmacologiques selon leurs actions sur l'organisme et classes thérapeutiques selon les pathologies traitées (**Anonyme 2**).

### 1.7. Différentes formes pharmaceutiques (galéniques) des médicaments

La forme galénique d'un médicament est sa présentation concrète : sirop, gélule, sachet, comprimé, pilule, granulés, ampoule, flacon à perfusion, seringue prête à l'emploi, ovule, collyre, aérosol, pommade, crème, ces formes sont les formes les plus courantes, (**Anonyme 1**).

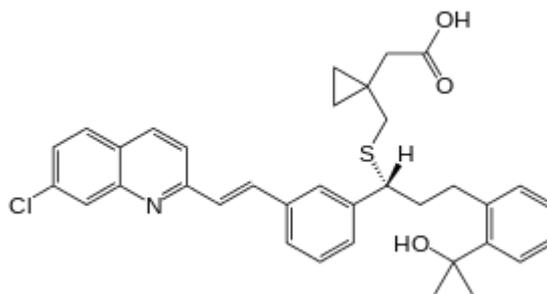
## 2. Présentation de MONTELUKAST10mg

### 2.1. Description du médicament

MONTELUKAST LDM 10 mg, comprimé pelliculé est un antagoniste des récepteurs aux leucotriènes qui bloque l'effet de substances appelées leucotriènes. Les leucotriènes provoquent un rétrécissement et un œdème des voies aériennes dans les poumons. En bloquant les leucotriènes, MONTELUKAST LDM 10 mg, comprimé pelliculé améliore les symptômes de l'asthme, contribue au contrôle de l'asthme et peut réduire les symptômes d'allergie saisonnière (appelée également rhinite allergique saisonnière ou rhume des foins).

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

---



**Figure 2:** la structure chimique d'une molécule de MONTELUKAST sodique.

Il est indiqué chez les patients âgés de 15 ans et plus dont l'asthme est insuffisamment contrôlé par leur traitement et qui nécessitent l'ajout d'un traitement complémentaire.

Il est également indiqué en prévention des symptômes d'asthme déclenchés par l'effort.

### 2.2. contenu de MONTELUKAST 10 mg

- La substance active : un comprimé pelliculé contient 10,40 mg de MONTELUKAST sodique équivalent à 10 mg de MONTELUKAST.

- Les autres composants :

- **Comprimés nus:** Laurylsulfate de sodium, lactose monohydraté, hydroxypropylcellulose, amidon prégélatinisé (maïs), carboxyméthylamidon sodique (maïs) (Type A), stéarate de magnésium.
- **Pelliculage :** Opadry jaune 20A23676 contenant : hydroxypropylcellulose, hypromellose, dioxyde de titane (E171), oxyde de fer jaune (E172), oxyde de fer rouge (E172).

### 2.3 Effets indésirables éventuels

Comme tous les médicaments, ce médicament peut provoquer des effets indésirables, mais ils ne surviennent pas systématiquement chez tout le monde. Ces effets sont :

**Très fréquent :** Infection des voies aériennes supérieures,

**Fréquent :**

- Diarrhées, nausées, vomissements
- Fièvre
- Éruption cutanée
- Augmentation des enzymes hépatiques

# Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

## Peu fréquent :

- Réactions allergiques incluant éruption cutanée, gonflement du visage, des lèvres, de la langue, et/ou de la gorge pouvant entraîner des difficultés à respirer ou à avaler
- Modification du comportement et de l'humeur [rêves anormaux incluant cauchemars, troubles du sommeil, somnambulisme, irritabilité, anxiété, fièvre, agitation incluant comportement agressif ou hostilité, dépression
- Étourdissements, somnolence, fourmillements/engourdissements des membres, convulsions.
- Sécheresse de la bouche, troubles digestifs.
- Douleurs articulaires ou musculaires, crampes musculaires.
- Faiblesse, fatigue, malaise, œdème causé par une rétention d'eau.



**Figure 3 :** MONTELUKAST LDM 10mg avant conditionnement

# Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

## Partie 2 : Contrôle qualité d'un médicament

L'association américaine des fabricants de produits pharmaceutiques a donné la définition suivante de la qualité d'un médicament, ou d'un produit assimilé : « c'est la somme de tous les facteurs qui contribuent directement ou indirectement à la sécurité, à l'activité et à l'acceptabilité du produit » (Juran. JM.1983).

Or, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 25% des médicaments utilisés dans les pays en voie de développement sont de faux médicaments ou sont de qualité inférieure. Parmi les médicaments contrefaits découverts, de nombreux cas ont montré des effets nocifs pour la santé. Dans des cas extrêmes, on pourra observer l'aggravation des pathologies traitées due à la présence de contaminations que ce soit chimiques ou microbiologiques (Barbureau.S.2006). Il est donc important de s'assurer de la qualité de ces médicaments.

### 1. Contamination

#### 1.1. Types de contamination

Il est possible de classer les contaminants aux catégories suivants :

##### 1.1.1. Contaminants particuliers

Il s'agit des particules inertes, poussières, fibres et toutes les substances qui n'entrent pas dans la composition du produit analysé. Ces contaminants ont plusieurs origines : tellurique, usure des équipements et des machines, humaine, procédés de fabrication... Pour une taille de particules donnée, la contamination particulière est mesurée en nombre de particules par unité de volume. Cette mesure est réalisée à l'aide d'un compteur de particules utilisant le phénomène physique de diffusion de la lumière (Auray, 2004).

##### 1.1.2. Contaminants chimiques

Il peut s'agir des principes actifs, produits intermédiaires, excipients ou agents de nettoyage de concentration plus ou moins importante.

# Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

## 1.1.3. Contaminants microbiologiques

Ce type de contamination regroupe l'ensemble des organismes vivants tels que les levures, moisissures, bactéries, virus. Dans des conditions favorables (température, humidité, pH, milieu nutritif,...), ils ont la propriété de se multiplier très rapidement et de former des biofilms.

La quasi-totalité des microorganismes présents dans l'environnement sont fixés sur des surfaces ou des particules. L'identification et le comptage de la contamination microbiologique peuvent être réalisés à l'aide de différentes techniques. La méthode par culture cellulaire, sur un milieu gélosé adapté au microorganisme recherché, est la plus courante. Dans ce cas, le dénombrement est réalisé directement par comptage des unités formant colonies (UFC) (Bolzan, 2008).

## 1.1.4. Contamination croisée

Cette contamination est définie dans les BPF comme la libération incontrôlée de poussières, gaz, vapeurs, aérosols ou organismes à partir des matières premières et des produits en cours de fabrication, des résidus provenant du matériel et des vêtements des opérateurs (ANSM, 2014).

On peut distinguer 2 types de contamination croisée :

**-La contamination successive** : elle est rencontrée quand une même verrerie est utilisée pour l'analyse de produits différents. Un résidu du précédent produit resté dans la verrerie va contaminer l'analyse suivante.

**-La contamination simultanée**: elle peut survenir lorsque deux produits différents sont fabriqués de façon simultanée dans deux zones proches.

Le personnel et le matériel peuvent être à l'origine d'une telle contamination en transportant le produit d'une zone vers une autre.

Il faudra donc mettre en place une maîtrise des flux pour que ces derniers ne se croisent jamais (Sliwinski, 1995).

# Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

## 1.2. Sources des contaminations

Il est possible de résumer les différentes sources de contamination par la méthode 5M, Cette méthode est très utilisée en production pour la résolution de problèmes afin de trouver les causes et de proposer les solutions adaptées pour éviter la récurrence des problèmes.

Les 5 éléments essentiels (Les 5 M) sont :

- Main d'œuvre (ensemble du personnel formé, qualifié) ;
- Matériel (locaux adaptés, équipements validés) ;
- Milieu (environnement intérieur et extérieur) ;
- Méthodes (procédés et procédures : écrits, traçabilité) ;
- Matières (matières premières, articles de conditionnement).

## 2. qualité

La qualité est un domaine très vaste qui peut être interprété de différentes manières selon le point de vue où l'on se trouve. Que l'on soit client ou producteur, la qualité sera perçue différemment.

### 2.1. Définition de la qualité

La qualité étant une activité, une manière d'être qui touche tous les domaines et tous les êtres humains, il n'est pas possible d'en donner une et une seule définition.

- Au début, l'ISO introduit la qualité dans l'ISO 8402 et la décrit comme étant : "l'ensemble des caractéristiques d'une entité qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire les besoins exprimés ou implicites" (ISO, 1994).

En 2000, L'ISO 8402 est supprimée pour être intégrée à la série des normes ISO 9000. Désormais, la qualité est décrite par l'ISO 9000 comme étant "Aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences" (ISO, 2015).

### 2.2. La qualité en industrie pharmaceutique

Les règles à suivre dans le domaine pharmaceutique pour obtenir un produit de qualité, en l'occurrence le médicament, sont décrites dans les Bonnes Pratiques de

# Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

Fabrication (BPF) ou Good Manufacturing practices (GMP). Les BPF décrivent les moyens, l'organisation et les contrôles à mettre en place.

Le but de l'industrie pharmaceutique est de produire un médicament de qualité, et cela passe par des études cliniques et précliniques poussées, une production maîtrisée, dans le but d'obtenir une balance bénéfique / risque suffisante pour satisfaire le patient. Il est possible de décrire un médicament de qualité quand il est:

- Efficace: effet thérapeutique requis et suffisant.
- Sûr: la santé du patient ne doit pas être mise en jeu.
- Contrôlé par un système qualité: qui garantit sa reproductibilité. (PBF,2014).

## 3. Contrôle qualité

### 3.1. Définition

Le mot contrôle peut être utilisé dans le sens de vérification ou dans celui de maîtrise. Le contrôle consiste à mesurer une ou plusieurs caractéristiques d'une entité et à comparer les résultats obtenus à des spécifications préétablies (Le Hir, 2001). Le contrôle de qualité constitue donc, permet de déceler les différents types d'erreurs qui existent lors des déterminations d'analyses quantitatives effectuées dans un laboratoire.

- L'erreur peut être grossière lorsqu'elle est due au non-respect du protocole expérimental, à une confusion de réactif, de matériel, à une faute de calcul ou de transcription du résultat. C'est le type d'erreur qui peut être évité. Sa fréquence dépend essentiellement du manipulateur (niveau de formation, cadence de travail, etc..).

- L'erreur est aléatoire lorsqu'elle se produit de façon fortuite ou accidentelle. Elle est due à l'impression d'une mesure consécutive à la défaillance momentanée du manipulateur ou d'un appareil.

- L'erreur systématique lorsqu'elle est due à un appareil déréglé un mauvais réactif (Sussland, 1996).

### 3.2. But du contrôle de la qualité

Le contrôle de qualité consiste à déceler les erreurs dépassant les limites jugées raisonnables de manière à en corriger les causes ou à les prévenir. En général dans

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

tout laboratoire de biologie, le contrôle du fonctionnement des appareils, de la manipulation ainsi que de la précision et l'exactitude d'une technique sont obligatoires (Vadeville, 1983).

Le contrôle effectué à des points clés (points critiques) évite d'engager inopportunément des frais coûteux dans la suite des opérations.

Le contrôle final détermine la conformité du produit aux objectifs et le contrôle de la conformité ont pour finalité de confirmer que le produit fabriqué localement ou importé répond aux normes homologuées et /ou aux spécifications légales et réglementaires qui le concernent (Anonyme3, 1997).

### 3.3. Contrôle qualité d'un médicament

L'OMS s'occupe non seulement des aspects pharmaceutiques de la qualité des médicaments mais encore de l'innocuité et de l'efficacité intrinsèque de leurs principes actifs (Anonyme4, 1998).

Le contrôle de la qualité consiste à vérifier que des caractéristiques sont conformes à des spécifications préétablies.

Il se fait :

- En amont, sur les intrants (les matières premières).
- En cours de fabrication : étapes intermédiaires (grains, comprimés avant pelliculage...).
- En fin de fabrication, sur le produit fini (Mathieur et *al.*1996).

#### • Le contrôle physico-chimique

Il aura pour rôle de vérifier la structure de la molécule et d'établir les propriétés physiques et chimiques. Il a pour but ainsi de vérifier de la substance annoncée (analyses qualitatives, réaction d'identification les plus sélectives possibles) et s'assurer de son bon usage (Albert et *al.*1974)

# Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

## • Le contrôle microbiologique

Les contrôles microbiologiques doivent permettre de garantir une bonne qualité hygiénique et marchande du produit fabriqué, et minimisent les pertes dues aux mauvaises conditions de fabrication (Scriban, 1999).

## • Le contrôle toxicologique

Les molécules destinées à la thérapeutique humaine doivent subir avant tout essai clinique des tests de toxicité aiguë et chronique sur les animaux. Ces tests toxicologiques permettent d'éliminer de très nombreuses molécules dont les risques outrepassent les avantages (Marcel et Garnier, 1987).

## Partie 3 : validation

### 1. Définition

La norme ISO 8402 définit la validation comme étant « la confirmation par examen et, apport de preuves tangibles que les exigences particulières pour un usage spécifique prévu sont satisfaites ».

### 2. Types de validation

#### 2.1. Validation des matières premières

Le processus de validation d'une forme solide commence par une validation des matières premières, tant le principe actif que les excipients. La variation des matières premières est une des causes majeures de variation du produit ou de résultats hors-spécifications. Il est important de contrôler la qualité des matières premières en qualifiant ces matériaux et leurs fournisseurs (Shadle P, 2004).

#### 2.2. Validation des équipements

La validation des équipements est une opération destinée à démontrer qu'une installation, un équipement, fonctionne correctement et donne réellement les résultats attendus. Les installations relatives aux principales utilités et équipements utilisées en production doivent être qualifiées (ANSM ET BPF .2014). La qualification est « l'action de fournir et documenter que l'équipement ou les matériels annexes sont correctement installés, fonctionnent correctement et fournissent en réalité les résultats attendus. La qualification est partie intégrante de la validation mais les étapes de qualification seules ne constituent pas la validation de procédé. » (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2000). Le processus de qualification se décompose en quatre étapes principales présentées ci-dessous :

- **La qualification de conception** : permet d'apporter les preuves documentées de la conformité de conception de l'équipement par rapport à la bonne pratique de fabrication et aux besoins internes de la société.
- **La qualification d'installation** : permet de fournir la démonstration, par le biais de la documentation, que tous les aspects essentiels de l'installation correspondent aux demandes approuvées et aux obligations réglementaires

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

- **La qualification opérationnel** : permet de prouver , à l'aide des documents précédemment établis, que le système et les sous –systèmes fonctionnent comme conçus ,dans tout la gamme de fonctionnement prévue dans le cahier de charge et /ou les spécifications ,et ce de façon répétée ,par une série d'essaies et de tests en dynamique .
- **La qualification de performance** : permet de fournir la preuve que les caractéristiques de fonctionnement et les produits résultants de ce fonctionnement sont conforme aux limites établies dans leurs spécifications, que les paramètres critiques sont stables pendant un temps défini ; correspondant à la durée de fonctionnement normal de l'équipement (HARPREETet *al.*,2013).

### 2.3.Validation des procédés de nettoyage

Le nettoyage des équipements fait partie du procédé pharmaceutique. La conception des équipements de production doit permettre un nettoyage et une inspection visuelle facile.

Afin que la qualité des produits fabriqués sur un équipement soit conforme aux spécifications, l'efficacité des procédés de nettoyage doit être démontrée scientifiquement et de manière documentée à l'aide de méthodes analytiques validées, spécifiques ou non spécifiques. Les agents de nettoyage doivent être évalués à la fois pour leur compatibilité entre eux et leur efficacité. Pour évaluer la compatibilité, les études doivent être menées pour démontrer que la méthode de nettoyage ne réagit pas avec les surfaces en contact. Pour évaluer l'efficacité du nettoyage, la méthode doit être mise à l'épreuve avec des types d'organismes variés (gram négatif, gram positif, levures...) pour démontrer son objectivité (Fetterolf, 2007).

### 2.4.Validation de la durée de stockage

Un intermédiaire de production existe dès que la forme chimique ou physique du produit change entre des étapes consécutives de production. Après chaque étape de production, l'intermédiaire de production peut être stocké : stockage exceptionnel ou faisant partie intégrante du processus de fabrication. La durée du stockage peut influencer l'efficacité et la pureté du principe actif ainsi que l'aspect ou les propriétés physiques et mécaniques du produit. Etant donné que la durée de stockage des

# Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

intermédiaires peut affecter la qualité et la sécurité du produit, elle doit être validée (Guidance for Industry, 1998).

## 2.5. Validation des méthodes de prélèvement

Les méthodes de prélèvements doivent être validées et leur reproductibilité doit être démontrée. Les prélèvements doivent être représentatifs du lot prélevé. Les prélèvements se font par des personnes formées.

## 2.6. Validation du procédé

La validation du procédé vise à vérifier que toutes les limites établies des paramètres critiques du procédé sont valides et qu'il est possible de fabriquer des produits satisfaisants, même dans les conditions les plus défavorables.

- **Validation prospective** : C'est une validation effectuée avant la production de routine de produits destinés à la vente ou sur un produit fabriqué selon un procédé modifié, comportant des modifications importantes pouvant se répercuter sur les caractéristiques du produit. (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, 2009).

- **Validation rétrospective** : La validation rétrospective est réalisée pour un médicament déjà commercialisé et est définie comme l'établissement de la preuve documentée qu'un système fait ce qu'il prétend faire sur la base des données relatives à la fabrication, aux essais et au contrôle du lot (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, 2009).

- **Validation concomitante** : C'est une validation réalisée durant la production de routine de produits destinés à la vente qui n'est utilisée qu'à titre exceptionnel et qui doit être justifiée (Tangri0et *al.*, 2012).

## 2.7. Validation analytique

### 2.7.1. Définition de la validation analytique

Selon l'OMS, la validation d'une méthode analytique : «Processus documenté démontrant qu'une méthode (ou procédure) analytique convient bien à l'usage voulu».

# Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

**FDA** : valider c'est l'établir à l'évidence, avec un degré de confiance élevée et sous une forme documentée, qu'un procédé déterminé permet d'obtenir un produit (ou service) qui atteint des spécifications définies à l'avance (FDA, 2014).

**BPF** : la validation c'est l'établissement de la preuve, en conformité avec les principes de bonne pratique de fabrication ; que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, ou produit ; activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés (BPF, 1998).

La clause 5.4.5.1. De la norme **ISO 17025:2005** définit la validation comme étant la confirmation par examen et fourniture de preuves réelles que les exigences particulièrement d'un usage projeté donné sont remplies (ISO, 2005).

On peut dire que la validation de la méthode est le processus utilisé pour confirmer que la procédure analytique utilisée pour un test spécifique est adaptée à l'utilisation prévue. Les résultats de la validation de la méthode peuvent être utilisés pour juger de la qualité, de la fiabilité et de la cohérence des résultats analytiques; c'est une partie intégrante de toute bonne pratique analytique.

## 2.7.2. Réglementation de la validation analytique

Le principe de la validation des procédures analytiques quantitatives est aujourd'hui largement répandu dans tous les domaines d'activité où des mesures sont réalisées. Cependant, cette question simple de l'acceptabilité ou non d'une procédure analytique pour une application donnée - reste toutefois inégalement et incomplètement résolue dans bien des cas, et ce malgré les diverses réglementations relatives aux Bonnes Pratiques (BPF, GMP...) et autres documents à caractère normatif (ISO, ICH, FDA...).

- 1997 : Publication STP PHARMA – Guide de validation des méthodes bioanalytiques (Guidance for Industry, 1998).

Tous les documents officiels décrivent les critères de validation à tester, mais ils ne proposent pas de protocole expérimental et se limitent le plus souvent aux concepts généraux.

Si ces premiers guides ont largement contribué à faire appliquer et progresser les validations analytiques, ils présentent toutefois des faiblesses quant aux conclusions

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

des tests réalisés et quant à l'aide à la prise de décision au regard de limites d'acceptation définies pour l'usage d'une procédure analytique.

La norme ISO 17025 :2005-exigence générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.

- Les règles OMS de bonnes pratiques applicables pour les laboratoires de CQ pharmaceutique OMS, 2010-annexe 1.

Elles contribuent à :

- ✓ promouvoir l'harmonisation internationale des pratiques des laboratoires
- ✓ faciliter la coopération entre établissements et la reconnaissance mutuelle des résultats
- La norme ISO 15189 :2012-exigences générales concernant les laboratoires d'analyses de biologie médicale.
- Pharmacopée européenne 9.2<sup>ème</sup> édition :
  - ✓ **Chapitre 2.6.1** contrôle microbiologique des produits stériles
  - ✓ **Chapitre 2.6.12 et chapitre 2.6.13** contrôles microbiologiques des produits non stériles.
  - ✓ **Chapitre 5.1.4.** qualification microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles.

### 2.7.3. But de validation

La validation, d'une manière générale, peut se définir comme la preuve documentée que le procédé, mis en œuvre dans des conditions opératoires précises et définies, permet d'obtenir de façon efficace, régulière et reproductible, un produit conforme à des spécifications préalables et décrites notamment dans les dossiers d'enregistrement.

Différentes raisons poussent les industriels à réaliser la validation de leurs procédés de fabrications tout d'abord, la validation est une exigence réglementaire et une étape indispensable dans le cycle de vie des médicaments en effet ,dans l'industrie pharmaceutique, elle fait partie des bonnes pratiques de fabrication (BPF) : « en vertu des BPF, les fabricants sont tenus de définir le travail de validation à effectuer, en vue de démontrer qu'ils contrôlent les aspects critiques de leurs opérations spécifiques » (ANSM ,2014)

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

De part, la complexité potentielle de la composition ou des procédés de fabrication des médicaments, des tests à libération effectués uniquement sur le produit fini ne seraient pas suffisants et ne permettraient pas d'assurer convenablement leur qualité. De ce fait, la validation des procédés va permettre de concevoir et de construire la qualité, la sûreté et l'efficacité au sien même du produit. Chaque étape du procédé de fabrication afin de s'assurer que le produit fini possédera toutes les caractéristiques requises pour l'efficacité du traitement et la sécurité du patient. Par conséquent, cela signifie non seulement que le produit doit répondre aux spécifications définies, mais aussi qu'il doit être fabriqué en suivant rigoureusement les méthodes décrites, et en suivant les mêmes conditions opératoires à chaque fois. (LEROUX et TANU,1997)

De plus, la validation est vue comme une démarche de progrès qui, grâce à une meilleure connaissance et une meilleure maîtrise des procédés, permet de diminuer les coûts de production. (ROMAN S, 1997 ; HARPREET et *al.*, 2013) en effet, pour les fabricants, la validation va permettre de :

- Mieux comprendre le procédé, réduisant ainsi les risques d'incidents lors de la production.
- Réduire les défauts (moins de retrainement).
- Alléger les contrôles en cours de production et en fin de fabrication (OMS,1996).

### 2.7.4. Structure de la validation analytique

La validation analytique, s'inscrit comme les autres validations, dans un cadre global de politique de validation. L'entreprise doit définir une politique générale de validation et d'orientation, ayant pour objectif premier l'assurance de la qualité et une meilleure maîtrise et compréhension de ses procédés.

La validation analytique intervient donc après que la validation du matériel et du procédé ait été effectuée. Il est à noter cependant que la validation analytique peut être concomitante à la validation du procédé de fabrication.

Cependant pour des raisons de gestion documentaire, notamment dans le cas de sites multi-produits, la validation de l'analytique peut faire l'objet de documents séparés (plan, protocole, rapport) (HARPREET et *al.*, 2013).

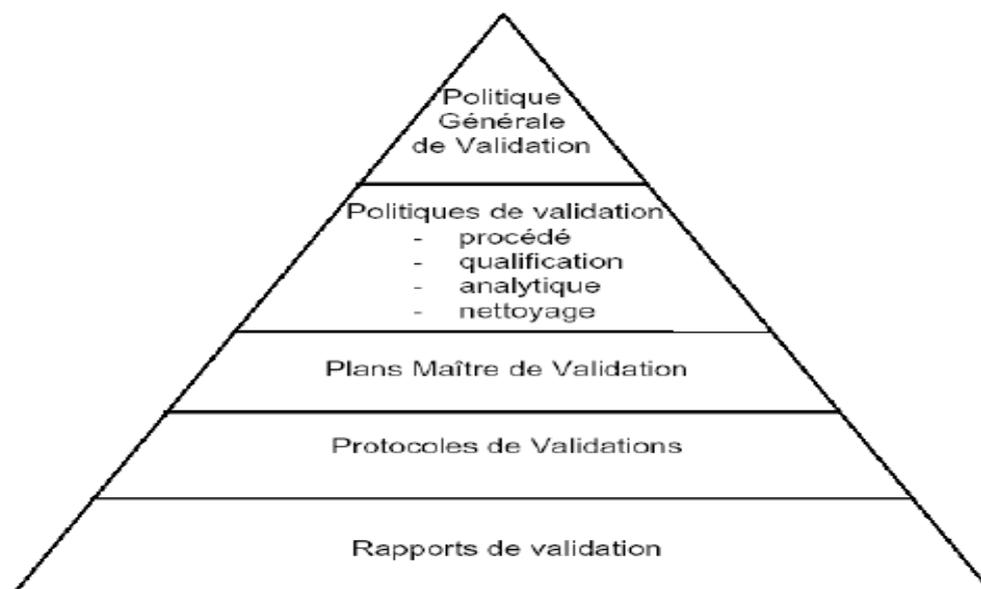


Figure 4 : Structure de la validation

### 2.7.5. Processus de validation

#### Si le laboratoire de Contrôle Qualité

- Utilise une méthode normalisée nationale / internationale, publiée par des organisations technique compétant.
- Participe à des essais inter laboratoires, organisée par un organisme indépendant.
- peut montrer que ses propres résultats lors de ces essais inter laboratoires sont corrects.
- a mis en place les exigences qualité (système de management de la qualité, formation du personnel, maîtrise de l'environnement, suivi méthodologique du matériel, traçabilité des réactifs et des mesures.

⇒ **Les méthodes analytiques peuvent être considérées comme validées**

**Exemple :** pharmacopées officielle ; Norme UNI, AFNOR (ISO17025, 2005).

#### Si le laboratoire de Contrôle Qualité

- utiliser une méthode complètement développée en interne.
- utilise une méthode connu, mais adaptée.
- utilise une méthode connue, mais employée en-dehors de son domaine d'application prévu.

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

⇒ Il faut prouver que la méthode est bien apte à l'emploi qu'on prévoit d'en faire, donc la valider.

- description de la méthode (procédure technique) contenant tous les éléments nécessaires à sa correcte application.
- le processus de validation doit être proportionnel aux exigences liées à l'application spécifique (ISO17025, 2005).

### 2.7.6. Revalidation

La revalidation permet de vérifier que des changements introduits, volontairement ou non, dans le procédé et/ou dans son environnement n'ont pas d'effets indésirables sur les caractéristiques du procédé et la qualité de produit (VARSHNEY et *al.*, 2013), (SHOALB. A, 2003). On distingue deux principales catégories de revalidation :

- La revalidation périodique : à intervalles déterminés, en vue de confirmer la maîtrise du procédé.
- La revalidation à la suite d'un changement pouvant avoir une incidence sur l'efficacité, la sûreté ou encore la qualité de produit. (VARSHNEY. *Petal.*, 2013 ; SHOALB, 2012)

### 2.7.7. Critères de la validation analytique

La validation analytique d'une méthode correspond à l'étude de plusieurs critères de validation définis ci-après.

- **La fidélité**

Exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle est exprimée en termes de coefficient de variation à partir d'une série de mesures.

La fidélité peut être évaluée à trois niveaux :

- **La répétabilité** : exprime la fidélité sous des conditions opératoires identiques et sur un court intervalle de temps ;

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

- **La fidélité intermédiaire** : exprime les variations intra-laboratoires : jours différents, analystes différents, équipements différents... ;
- **La reproductibilité** exprime la fidélité inter-laboratoire.

L'exactitude d'une méthode combine justesse et fidélité d'un mesurage (Note for guidance on validation of analytical procedures (ICH Q2 (R1))).

- **Robustesse**

La robustesse est la qualité d'une méthode capable de donner des résultats d'une exactitude et d'une précision acceptables dans des conditions diverses.

Elle permet d'évaluer dans quelle mesure les résultats obtenus sur des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser, subissent l'influence des changements, dans la limite des spécifications établies pour la méthode (Note for guidance on validation of analytical procedures: (ICH Q2 (R1))).

- **Sensibilité**

La sensibilité est l'aptitude de la méthode à détecter de petites variations de concentration. Elle est représentée par la pente de la courbe d'étalonnage.

- **La justesse d'une méthode**

Exprime l'écart de l'accord entre la valeur qui est acceptée soit comme vraie, soit comme valeur de référence, et la valeur trouvée (Hubert et *al.*, 2003).

- **La limite de détection d'une procédure d'analyse**

Elle représente la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure (Note for guidance on validation of analytical procedures (ICH Q2 (R1))).

# Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

- **La spécificité ou sélectivité d'une procédure analytique**

La spécificité est sa capacité à permettre l'évaluation univoque de la substance à analyser en présence d'autres composés potentiellement présents (Note for guidance on validation of analytical procedures (ICH Q2 (R1))).

- **La linéarité d'une procédure d'analyse**

Elle représente sa capacité à prédire des concentrations retrouvées proportionnelles aux concentrations théoriques d'une série d'échantillons (Note for guidance on validation of analytical procedures (ICH Q2 (R1))).

- **La limite de quantification**

La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie (Note for guidance on validation of analytical procedures (ICH Q2 (R1))).

- **L'incertitude**

L'incertitude est un paramètre associé au résultat d'une mesure qui caractérise la dispersion des valeurs que l'on peut raisonnablement attribuer à un mesurage (Feinberg et Laurent, 2006).

- **La limite d'acceptabilité d'une méthode**

Il s'agit d'une valeur seuil globale exprimée le plus souvent sous forme de pourcentage, fixée de préférence par l'utilisateur du résultat (Note for guidance on validation of analytical procedures (ICH Q2 (R1))).

### **3. Validation microbiologique**

La présence de certains micro-organismes dans des préparations non stériles peut réduire voire annuler l'activité thérapeutique du produit, et constitue un danger potentiel pour la santé du patient. Les fabricants sont donc tenus d'assurer une faible charge microbienne (bio charge) dans les formes pharmaceutiques finies, par la mise en œuvre des textes en vigueur sur les BPF au cours de la fabrication, de la conservation et de la distribution des préparations pharmaceutiques.

# Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

La présence de la flore mésophile doit être règlementairement, ou pour des raisons économiques, recherchée et quantifiée sur des très nombreux produits qui concernent les produits de santé, la démarche est, quels que soit les textes règlementaires suivis, la même.

Les principaux microorganismes d'importance dans l'industrie pharmaceutique sont :

- ✓ **Lesbactéries** : *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichiacoli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Psoudomas*, *Listeria*, *Brevibacterium*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, bactéries lactiques, bifidobactéries.
- ✓ **Champignons** : *Penicillium*, *Aspergillus*, Levures.

## ➤ **Prise d'essai**

Sauf indication contraire, 10g ou 10 ml du produit à examiner, prélevé avec précautions sont utilisés. Pour les liquides ou solides en aérosols, l'échantillonnage est effectué sur 5 boîtes par contre pour les dispositifs transdermique, l'échantillonnage est effectué sur 10 dispositifs. Pour les produits en boîtes (blisters), des prélèvements au hasard effectués.

Pour obtenir la quantité requise, mélanger le contenu d'un nombre de boîtes suffisant pour former l'échantillon (Ph. Eur. 9<sup>ème</sup>, 2.6.12, 2009).

### **3.1 Echantillonnage**

Le prélèvement doit être effectué par du personnel formé aux techniques de prélèvements microbiologiques afin d'éliminer tout risque de contamination accidentelle du produit. Le plan d'échantillonnage dépend de nombreux paramètres tels que taille du lot, caractéristiques du produit, niveau de contamination présumé du produit, homogénéité de distribution des micro-organismes.

Dans le cas de dispositifs, le nombre d'éléments prélevés devra être représentatif du lot.

### **3.2 Examen de l'échantillon**

La méthode de préparation des échantillons dépend des caractéristiques physiques du produit à examiner. Si aucune des procédures décrites ci-après ne s'avère

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

satisfaisante, il est nécessaire de développer une autre procédure (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.12,2009).

- **Produits hydrosolubles:** dissoudre ou diluer le produit à examiner (on prépare généralement une dilution au 1/10 dans la solution tampon peptone au chlorure de sodium pH7, de la solution tampon phosphate pH7, 2 ou du milieu liquide aux peptones de caséine et de soja. Ajustez si nécessaire à pH 6-8. Les dilutions suivantes, le cas échéant, sont préparées avec le même diluant (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.12,2009).
- **Produit de nature non lipidique insoluble dans l'eau :** mettez le produit à examiner en suspension (comme dans le cas des produits hydrosolubles). Un agent tensioactif tel que du polysorbate 80 à la concentration de 1g/L peut être ajouté pour faciliter la mise en suspension des substances difficilement mouillables (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.12,2009).
- **Produits de nature lipidique :** dissoudre le produit à examiner dans du myristate d'isopropyle stérilisé par filtration, ou mélanger-le avec la quantité minimum requise de polysorbate 80 stérile ou d'un autre agent tensioactif non inhibiteur stérile, chauffé si nécessaire à une température ne dépassant pas 40°C ou dans certains cas exceptionnelles 45°C.  
Mélanger soigneusement et maintenez si nécessaire à température voulue, dans un bain-marie. Ajouter le diluant choisi, préalablement chauffé, en quantité requise pour obtenir une dilution au 1/10 du produit initial.  
Mélanger soigneusement tout en maintenant à la même température pendant le temps minimum nécessaire à la formation d'une émulsion.  
Les dilutions au 1/10 suivantes peuvent être préparées avec le diluant choisi additionné d'une quantité appropriée de polysorbate 80 stérile (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.12,2009).
- **Produits liquides ou solide sous forme d'aérosol :** transférer aseptiquement le produit dans une membrane filtrante ou dans un récipient stérile, pour les échantillonnages suivants. Utiliser pour chacun des récipients à examiner soit la totalité du contenu, soit un nombre défini de produits (aérosols à valve doseuse) (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.12,2009).

# Chapitre 1 : Revue bibliographique

## 3.3. Les paramètres de recherche selon la Pharmacopée Européenne

Le contrôle microbiologique des produits non stériles est réalisé selon les méthodes décrits dans la pharmacopée européenne 9.2<sup>ème</sup> édition. Le tableau 1 donne des critères d'acceptation applicables aux produits pharmaceutiques non stériles sur la base de dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) et du dénombrement des moisissures/levures totales (DMLT). Ces critères d'acceptation reposent sur des résultats individuels, ou sur des résultats moyens lorsque l'on effectue plusieurs dénombrements (réplicas), par exemple pour le dénombrement sur plaques (Ph. Eur. 9<sup>ème</sup>, 5.1.4, 2009).

**Tableau 1:** critères d'acceptation de la qualité microbiologique des formes pharmaceutiques non stériles

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 d' <i>Escherichia coli</i> (1g ou 1 ml)
Voie orale : préparation aqueuses	$10^2$	$10^1$	Absence d' <i>Escherichia coli</i> (1g ou 1 ml)

### 3.3.1. DGAT (Dénombrement des Germe Aérobies Mésophiles Viables Totaux) et DMLT (Dénombrement des Levures et des Moisissures Totales).

Des essais séparés pour chacun de microorganismes cités sont effectués. Seuls sont dénombrés les microorganismes de la souche d'ensemencement.

#### ➤ Filtration sur membrane

Des membranes filtrantes ayant un diamètre nominal des pores d'au maximum 0,45µm sont utilisées. Le matériau constituant les membranes est choisi de telle sorte que l'efficacité de rétention bactérienne ne soit pas affectée par le constituant de

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

l'échantillon à examiner. Une membrane filtrante est utilisée pour chacun des microorganismes cités.

Introduire dans la membrane filtrante une quantité appropriée de l'échantillon préparé (de préférence l'équivalent de 1 g de produit, ou moins si le nombre présumé d'UFC est élevé), filtrer immédiatement et rincer le filtre avec un volume approprié de diluant.

Pour le dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT), transférez la membrane sur du milieu gélosé aux peptones de caséines et de soja.

Pour le dénombrement des moisissures/levures totales (DMLT), transférez la membrane sur du milieu sabouraud-dextrosé-gélosé. Incubez les boîtes comme indiqué dans le tableau 1 (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.12,2009).

### ➤ **Dénombrement sur plaque**

Le dénombrement sur plaque est effectué au moins 2 fois pour chaque milieu et la moyenne des deux résultats est utilisée.

#### ✓ **Ensemencement en profondeur**

Pour des boîtes de pétri de 9cm de diamètre, 1ml de l'échantillon est introduit, puis 15-20 ml de milieu gélosé aux peptones de caséines et de soja ou de milieu sabouraud-dextrosé-gélosé à une température ne dépassant pas 45°C.

Si les boîtes de pétri utilisées sont plus grandes, augmenter en conséquence le volume de milieu gélosé. Deux boîtes de pétri au minimum sont utilisées pour chacun des microorganismes cités dans le tableau 2.

Les boîtes sont incubées comme indiqué dans le tableau 2. La moyenne arithmétique des dénombrements par milieu est faite ainsi que le calcul du nombre d'UFC dans l'inoculum initial (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.12,2009).

#### ✓ **Étalement en surface**

Les boîtes de pétri sont préparées de la même façon que précédemment.

Un volume d'au moins 0,1ml de l'échantillon est étalé la surface du milieu. L'incubation et le dénombrement sont réalisés comme indiqué en ensemencement en profondeur (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.12,2009).

# Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

## ➤ Méthode du nombre le plus probable (NPP)

La méthode de NPP présente une fidélité et une exactitude inférieure à celles de la filtration sur membrane ou de dénombrement sur plaque. Elle donne notamment des résultats peu fiables pour le dénombrement des moisissures.

Elle est donc à réserver aux DGAT pour lesquels le recours aux autres méthodes est impossible. Si l'emploi de cette méthode est impossible.

Si l'emploi de cette méthode est justifié, procédez comme suit.

Au moins trois dilutions en série au 1/10 du produit sont préparées. Ces dilutions sont préparées sur un milieu liquide aux peptones de caséine et de soja. Si nécessaire un agent tensioactif est additionné tel que le polysorbate 80 ou d'un neutralisant de l'activité antimicrobienne.

Tous les tubes sont incubés à 30-35°C pendant au maximum 3 jours. Si la nature du produit à examiner rend la lecture des résultats difficile ou incertaine, une subculture est effectuée dans le même milieu liquide ou sur du milieu gélosé aux peptones de caséines et de soja. L'incubation est faite à la même température pendant 1-2 jours.

Le nombre le plus probable de microorganismes est déterminé par gramme ou millilitre de produit à examiner (Ph. Eur. 9<sup>ème</sup>, 2.6.12, 2009).

### 3.3.2. *Escherichia coli*

L'ensemencement de 10 ml d'échantillon ou la quantité correspondant à 1 g ou 1 ml de produit est effectué sur une quantité appropriée déterminée comme décrit sous 3.4.1.2 partie d'Applicabilité de la méthode d'essai) de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja avec. Mélanger, puis incubez à 30-35°C pendant 18-24h (Ph. Eur. 9<sup>ème</sup>, 2.6.13, 2009).

### 3.4. Applicabilité des méthodes

L'aptitude de l'essai à permettre la détection des microorganismes en présence du produit doit être établie. L'applicabilité de la méthode d'essai doit être confirmée chaque fois qu'un changement susceptible d'affecter les résultats de l'essai est apporté au mode opératoire ou au produit.

Pour vérifier les conditions opératoires, un contrôle sur témoin négatif est effectué en substituant le diluant choisi à la préparation à examiner. Aucune croissance

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

microbienne n'est observée. Un contrôle sur un témoin négatif est également effectué lors de l'examen du produit comme décrit dans 3.5. L'obtention d'un résultat non conforme nécessite une investigation (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.12,2009).

### 3.4.1. Fertilité des milieux, paramètres d'analyse et souches de référence

#### 3.4.1.1. Pour les DGAT et DMLT

Ce contrôle est effectué sur chaque lot de milieu, qu'il soit acheté prêt à l'emploi ou préparé à partir d'un milieu déshydraté ou des ingrédients décrits.

Pour se faire, deux ensemencements sont réalisés avec un petit nombre (au maximum 100UFC) des microorganismes indiqués dans le tableau 2, le premier sur des fractions/plaques de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja et de milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja, en utilisant pour chacun une fonction/plaque de milieu séparé. Le deuxième est réalisé sur des plaques de milieu sabouraud-dextrosé-gélosé (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.12,2009).

**Tableau 2** : préparation et emploi des microorganismes de référence.

Microorganismes	Préparation de la souche de référence	Fertilité des milieux		Applicabilité de la méthode de dénombrement en présence du produit	
		Germe aérobies totaux	Moisissures et levures	Germe aérobies totaux	Moisissures et levures
<i>Staphylococcus aureus</i> par exemple : ATCC6538 NCIMB9518 CIP 4.83 NBRC 13276	Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ou milieu liquide aux peptones de caséine et de soja 30-	Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja et milieu liquide aux peptones de caséine et de soja <= 100 UFC 30-35°C<=3jours		Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja/NPP : milieu liquide aux peptones	

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

	35°C 18-24h			de caséine et de soja <=100 UFC 30- 35°C <=3jours	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> par exemple : ATCC 9027 NCIMB 8626 CIP 82.118 NBRC 13275	Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ou milieu liquide aux peptones de caséine et de soja 30-35°C 18-24h	Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja et milieu liquide aux peptones de caséine et de soja <= 100 UFC 30-35°C<=3jours		Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja/NPP : milieu liquide aux peptones de caséine et de soja <=100 UFC 30-35°C <=3jours	
<i>Bacillus subtilis</i> par exemple : ATCC 6633 NCIMB 8054 CIP 52.62 NBRC 3134	Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ou milieu liquide aux peptones de caséine et de soja 30-35°C 18-24h	Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja et milieu liquide aux peptones de caséine et de soja <= 100 UFC 30-35°C<=3jours		Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja/NPP : milieu liquide aux peptones de caséine	

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

				et de soja ≤100 UFC 30- 35°C ≤3jours	
<i>Candida albicans</i> par exemple : ATCC 10231 NCPF 3179 IP 48.72 NBRC 1594	Milieu sabouraud- dextrosé- gélosé ou milieu liquide sabouraud- dextrosé 20- 25 °C 2-3jours	Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ≤ 100 UFC 30- 35 °C ≤ 5jours	Milieu sabouraud- dextrosé- gélosé ≤ 100 UFC 20-25 °C ≤ 5jours	Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ≤ 100 UFC 30- 35 °C ≤ 5jours NPP : non applicable	Milieu sabouraud- dextrosé-gélosé ≤ 100 UFC 20-25 °C ≤ 5jours
<i>Aspergillus brasiliensis</i> par exemple : ATCC 16404 IMI 149007 IP 1431.83 NBRC 9455	Milieu sabouraud- dextrosé- gélosé ou milieu dextrosé- gélosé à la pomme de terre 20-25 °C 5-7 jours, ou jusqu'à sporulation satisfaisante	Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ≤ 100 UFC 30- 35 °C ≤ 5jours	Milieu sabouraud- dextrosé- gélosé ≤ 100 UFC 20-25 °C ≤ 5jours	Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ≤ 100 UFC 30- 35 °C ≤ 5jours NPP : non applicable	Milieu sabouraud- dextrosé-gélosé ≤ 100 UFC 20-25 °C ≤ 5jours

Pour les milieux solides, la croissance obtenue ne doit pas différer de plus d'un facteur 2 de la valeur calculée pour un inoculum standardisé.

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

Pour l'inoculum récemment préparé, la croissance des microorganismes doit être comparable à celle observée avec un lot de milieu précédemment contrôlé et approuvé.

Les milieux liquides conviennent si l'on observe une croissance clairement visible des microorganismes, comparable à celle obtenue sur un lot de milieu précédemment contrôlé et approuvé (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.12,2009).

### 3.4.1.2.Fertilité et propriétés inhibitrices des milieux, applicabilité de la méthode d'essai pour la recherche des microorganismes spécifiés

L'aptitude de l'essai à permettre la détection des microorganismes en présence du produit à examiner doit être établie. L'applicabilité de la méthode d'essai doit être confirmée chaque fois qu'un changement susceptible d'affecter le résultat de l'essai est apporté au mode opératoire ou au produit (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.13,2009).

#### ➤ Fertilité et propriété inhibitrices des milieux

Effectuer ce contrôle sur chaque lot de milieu, qu'il soit acheté prêt à l'emploi ou préparé d'un milieu déshydraté ou des ingrédients décrits.

Vérifier que les milieux concernés présentent les propriétés voulues (voir tableau 3).

**Tableau 3** : fertilité, propriétés inhibitrice et propriétés indicatives des milieux.

	Milieu	Propriétés	Microorganisme de référence
<b>Recherche d'<i>Escherichia coli</i></b>	Milieu liquide de MacConKey	Fertilité	<i>E. coli</i>
		Inhibition	<i>S. aureus</i>
	Milieu gélosé de MacConKey	Fertilité + indication	<i>E. coli</i>

Contrôle de la fertilité sur un milieu liquide : une petite quantité (au maximum 100 UFC) du microorganisme estensemencée sur un échantillon du milieu approprié. Les

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

préparations sont incubées à la température spécifiée pendant une durée inférieure ou égale à la durée minimale spécifiée pour l'essai.

Une croissance clairement visible du microorganisme, comparable à celle obtenue sur un lot de milieu précédemment contrôlé et approuvé, est observée (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.12,2009).

### ➤ **Applicabilité de la méthode d'essai**

Pour chaque produit à examiner, la préparation de l'échantillon est réalisée comme décrit dans le paragraphe approprié de la section 3.3. Chaque souche de référence est ensemencée au moment du mélange, dans le milieu prescrit. L'essai est effectué individuellement avec chaque souche de référence en utilisant un nombre de microorganismes équivalent, au maximum, à 100 UFC.

Les résultats indicatifs décrits dans la section 3.3, doivent montrer la présence des microorganismes spécifiés.

Si le produit présente une activité antimicrobienne, il faut apporter les modifications voulues à la procédure d'essai (voir 3.6).

S'il s'avère possible de neutraliser l'activité antimicrobienne exercée par un produit donné sur un microorganisme dont la recherche est prescrite, ce microorganisme sera présumé ne plus être présent dans le produit (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.13,2009).

### **3.5. Contrôle des produits**

#### ➤ **Sélection et subculture**

1ml du milieu liquide aux peptones de caséine et de soja est transféré dans 100ml de milieu liquide de MacConKey et incubé à 30-35°C pendant 18-72h.

Donc la croissance de colonies indique la présence possible d'*E. coli*, à confirmer par des essais d'identification.

Le produit satisfait à l'essai si l'on n'observe la présence d'aucune colonie ou si les essais de confirmation de l'identification sont négatifs (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.13,2009).

# Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

## ➤ Inoculation et dilution

Un volume de la suspension microbienne est ajouté à l'échantillon et à un témoin (ne contenant pas le produit à examiner). Ce volume doit être suffisant pour obtenir un inoculum d'au maximum 100 UFC et ne doit pas dépasser 1% du volume du produit dilué.

Pour démontrer que le recouvrement microbien est acceptable, il faut effectuer l'essai sur l'échantillon préparé avec le plus bas facteur de dilution possible. Si l'activité antimicrobienne ou la faible solubilité du produit l'interdit, un protocole spécifique doit être développé. S'il est impossible d'éviter autrement une inhibition de la croissance par l'échantillon, on peut procéder à une neutralisation, dilution ou filtration avant addition de la suspension microbienne (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.12,2009).

### 3.6.Neutralisation/élimination de l'activité antimicrobienne

Il peut parfois être nécessaire de neutraliser un possible pouvoir antimicrobien en additionnant le diluant d'agents neutralisants.

Ainsi, par exemple, le jaune d'œuf est utilisé pour neutraliser les composés à fonction ammonium quaternaire, le thiosulfate de sodium pour neutraliser les composés halogénés.

Les teneurs en agents neutralisants peuvent être augmentées si nécessaire mais, dans tous les cas l'efficacité et la non toxicité à l'égard des micro- organismes considérés doivent être prouvées (Mode d'emploi - Milieux en flacons prêts à l'emploi, 2008).

Si le produit à examiner possède une activité antimicrobienne, celle-ci est autant que possible éliminée ou neutralisée. Si des neutralisants de l'activité antimicrobienne sont utilisés à cet effet, leur efficacité et leur absence de toxicité à l'égard des microorganismes considérés doivent être démontrées.

Si des substances tensioactives sont utilisées pour la préparation des échantillons, leur absence de toxicité à l'égard des microorganismes considérés et leur compatibilité avec les neutralisants utilisés doivent être démontrées.

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

Comparez le recouvrement microbien respectivement obtenu à partir de l'échantillon préparé, dilué comme décrit en 3.5, (inoculation et diluant) et incubé selon la procédure décrit en 3.3.1, et de la préparation témoin.

En cas d'inhibition de la croissance (réduction de plus d'un facteur 2), apportez à la procédure suivie pour l'essai de dénombrement concerné les modifications nécessaire pour garantir la validé des résultats.

Ces modifications peuvent par exemple consister à une augmentation du volume du diluant ou du milieu de culture, l'incorporation au diluant d'agent neutralisants spécifiques ou généraux, une filtration sur membrane ou une combinaison des modifications précitées (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.12,2009).

- **Agents neutralisants**

Des agents peuvent être utilisés pour neutraliser l'activité de substances antimicrobiennes interférentes (tableau 4). Ils peuvent être ajoutés au milieu, de préférence avant la stérilisation. L'efficacité de tout neutralisant utilisé et son absence de toxicité à l'égard des microorganismes doivent être démontrées au moyen d'un blanc comportant le neutralisant mais non le produit (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.12,2009).

**Tableau 4** : agents usuels de neutralisation des substances interférentes.

Substance interférente	Méthode de neutralisation possible
Glutaraldéhyde, mercuriels	Hhydrogénosulfite de sodium (bisulfite de sodium)
Phénolique, alcool, aldéhydes, sorbate	Dilution
Aldéhydes	Glucine
Ammoniums quaternaires (QAC), parahydroxybenzoates (parabènes), bis-biguanides	Lécithine
QAC, iode, parabène	Polysorbate
Mercuriels	Thiglycolate
Mercuriels, halogènes, aldéhydes	Thiosulfate
EDTA (édétate)	Ions Mg <sup>2+</sup> ou Ca <sup>2+</sup>

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

Lors de la vérification de l'applicabilité de la méthode de filtration sur membrane ou de dénombrement sur plaques, le nombre moyen obtenu pour chacun des microorganismes de référence ne doit pas diffère de plus d'un facteur 2 de la valeur obtenue en l'absence du produit pour le témoin défini **3.5** (inoculation et diluant). Lors de la vérification de l'applicabilité de la méthode NPP, la valeur calculée à partir de l'inoculum doit se situer dans les limites de confiance à 95% des résultats avec le témoin.

Si ces critères sont impossibles à satisfaire pour un ou plusieurs microorganismes soumis à l'essai par l'une des méthodes décrites, il y a lieu d'utiliser pour examiner le produit la méthode et les conditions d'essai qui permettent de s'en approcher le plus (Ph. Eur.9<sup>ème</sup>, 2.6.12,2009).

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

---

VVG

**Chapitre II :**

**Matériel et**

**Méthodes**

Ce travail a pour but de décrire la validation de la méthode d'analyse microbiologique de **MONTELUKAST 10mg** afin de démontrer que la méthode convient pour l'usage auquel elle est destinée, de démontrer ainsi que la méthode utilisée par le groupe LDM permet de détecter une contamination sur les tests suivant : DGAT, DMLT, recherche E. coli en respectant les spécifications selon la pharmacopée européenne 9.2 eme édition .

### 1. Présentation de la société de stage

Dans le cadre de notre stage de fin d'étude, on a pu participer à un projet de validation microbiologique d'une méthode d'analyse de MONTELUKAST 10mg au sein du laboratoire de contrôle qualité du groupe pharmaceutique LDM.

Le groupe LDM est né du désir de ses fondateurs de construire une entreprise compétitive et réussie. C'est une entreprise familiale fondée par les frères ELAMMOUCHI, Mohamed Ahmed et Mouloud en 1997. «Confiance, loyauté et respect pour les partenaires». Fidèle aux nouvelles demandes dans un monde de production de drogue hautement efficace et en constante évolution en Algérie, LDM s'engage à contribuer efficacement à l'amélioration de la couverture sanitaire dans le pays; Joindre le savoir-faire étendu à la qualité selon les normes internationales.

Son unité de production est certifiée par le gouvernement algérien, ainsi que par des laboratoires internationaux bien connus. Différentes forme posologiques sont produites par LDM entre autre la forme sèche, Comprimés, capsules.....

### 2. Champs d'application

Ce protocole s'applique sur l'analyse des lots : **MONTELUKAST 10mg**.

### 3. Référence

Pharmacopée européenne 9.2ème édition (chapitre 5.1.4, chapitre 2.6.12, chapitre 2.6.13).

### 4. Produit à étudier

**MONTELUKAST 10mg**: lots: 001V, 002V, 003V

DCI/Forme/Dosage: **MONTELUKAST 10mg/comprimé/10mg**.

**Tableau 5** : les lots à étudier et leurs DDP et DDF.

Numéro de lot	DDF	DDP
001V	12/2017	11/2019
002V	12/2017	11/2019
003V	12/2017	11/2019

### 5. Matériels et équipements

- Boîtes de pétri stériles 90 mm.
- Pipettes pasteur stériles.
- Pipettes graduées stériles.
- Flacons ou Erlenmeyer avec bouchons stériles.
- Pro pipettes.
- Hotte à flux laminaire (LB009).
- Incubateurs à : 23°C (LB66), 33°C (LB029-LB026) et 43°C (LB026).
- Compteur de colonies (LB019)
- Agitateur Vortex (LB007)
- Bain-marie (LB008).
- Microscope (LB010).
- Tubes avec bouchons stériles

### 6. Réactifs et milieux de culture

- Solution tampon peptonée au chlorure de sodium PH=7 + 3% tween + 0.3% lécithine (diluante et milieu de neutralisation).
- Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja TSA.
- Milieu Sabouraud-dextrosé gélosé SDA.
- MacConKey Bouillon MCB.
- MacConKey Agar MCA.
- Milieu liquide aux peptones de caséine et de soja TSB.
- Milieu gélose nutritive (GN).

**Tableau 6** : les milieux de cultures utilisés lors de la validation et leurs numéros de lot, DDF et DDP.

Milieu de culture	Lot	DDF	DDP
TSA	06/MC/D0002/27+28	11/02/2018	10/02/2019
SDA	124/MC/D0003/21+22	25/12/2017	24/12/2018
TSE+ tween+ lécithine	14/MC/D0030/11	27/02/2018	26/08/2018
TSB	01/MC/D0001/30+31	03/01/2017	02/07/2018
MCB	04/MC/D0006/21+22	16/01/2018	15/07/2018
MCA	02/MC/D0007/06+07	07/01/2018	06/01/2019

### 7. Types de recherches à effectuer et souches de références utilisées

Les types de recherches à effectuer selon le dossier technique de MONTELUKAST 10mg sont :

- **DGAT** : dénombrement des germes aérobies totaux.
- **DMLT** : dénombrement des levures et moisissures totaux.
- **Recherche spécifique** : *Escherichia coli*

Dans chaque paramètre on utilise des souches de références appropriées, comme il est indiqué au-dessous:

#### ✓ Pour DGAT

- *Candida albicans* ATCC10231.
- *Staphylococcus aureus* ATCC6538.
- *Bacillus subtilis* ATCC6633.
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC9027.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027.

#### ✓ Pour DMLT

- *Candida albicans* ATCC10231.
- *Aspergillus basiliensis* ATCC9027.

#### ✓ pour la recherche d'*E. coli* :

- *Escherichia coli* ATCC8739.

### 8. Paramètres de validation

Les critères de validation utilisés sont :

- Fidélité regroupe la reproductibilité (3lots) et la répétabilité (3 fois).
- Limite de détection : 10 UFC. (si on utilise la dilution 1/10) ou 100 UFC (si on utilise la dilution 1/100)
- Le critère d'acceptation est déterminé par le taux de recouvrement qui doit être :
  - ✓ Pour les DGAT et DMLT : compris entre 0.50 et 2.00
  - ✓ Pour la recherche *E. coli* : le contrôle positif doit être comparable avec le témoin positif.

Il doit être conforme pour tous les germes pour que la méthode utilisée soit validée

- ✓ Pour les DGAT et DMLT : Taux de recouvrement = l'ajustement D /moyenne du dénombrement du témoin positif(en absence de produit (t+) et en présence des contaminants)

L'ajustement D : moyenne du dénombrement du contrôle positif en présence de produit (c+) contaminé avec chaque souche séparément - essai (représente l'analyse en présence du produit et en absence des contaminants)

- ✓ Pour *E. coli* : Vérifier le recouvrement d'Escherichia coli et l'aspect macroscopique des colonies (couleur et forme), il doit être comparable sur le contrôle positif en présence du produit et des contaminants et celui du témoin positif.

### 9. Paramètres de recherches

Lors du dénombrement des souches utilisées lors de la validation, chaque type de recherche a sa spécification (le nombre de colonie par gramme acceptable établie par la pharmacopée européenne) et leurs milieux de culture appropriés. Ces paramètres sont mentionnés dans le tableau suivant.

**Tableau 7:** spécifications techniques microbiologiques et les milieux de cultures utilisé.

Dénombrement	Spécification	Milieux
<b>DGAT</b>	$\leq 10^3$ UFC /g	TSA
<b>DMLT</b>	$\leq 10^2$ UFC/g	SDA
<b><i>E.coli</i></b>	$\leq$ absence /g	MCA, MCB, TSB

### 10. Les étapes de neutralisation de MONTELUKAST 10 mg

- Fixer la dilution 1/10 de l'échantillon soit 10g du produit dans 90ml de diluant (la limite de détection est à 10UFC)
- La structure chimique d'une molécule de MONTELUKAST 10mg, contient une molécule de Chlore qui peut influencer sur les souches de référence, on va donc utiliser le TSE+3% thiosulfate comme neutralisant spécifique,
- Si l'utilisation de TSE+3% thiosulfate ne donne pas de bons résultats, on va essayer avec le TSE+3% TWEEN qui est un neutralisant standard
- Si l'utilisation de TSE+3% TWEEN ne donne pas de bons résultats, on va essayer avec le TSE+3% TWEEN+0.3% lécithine qui est un neutralisant standard
- Si l'utilisation de TSE+3% TWEEN+0.3% lécithine ne donne pas de bons résultats, on va essayer avec une dilution supérieure de l'échantillon soit 1/100 soit 10g dans 90ml du diluant (échantillon1), puis transférer 10ml de l'échantillon 1 dans 90 ml du diluant, mais cette deuxième dilution ne s'applique que sur les deux paramètres DGAT et DMLT car la limite de détection va augmenter à 100 UFC, puis refaire les expériences en suivant les mêmes étapes précédentes.

### 11. Prise d'essai

10 g de **MONTELUKAST 10mg**, c'est l'équivalent de 48 comprimés (la masse moyenne d'un comprimé est de 207mg  $\pm$ 5%)

### 12. Calibration de la charge microbienne de chaque souche de référence

L'objectif de Cette étape est de décrire la charge microbienne de chaque souche de référence une méthode pour calibrer le nombre d'UFC de chaque souche de référence et de bien déterminer le dosage en UFC par millilitre afin d'utiliser cette méthode dans d'autre domaine (validation des milieux de culture, validation des méthodes d'analyse..)Mettre les souches de références à une température ambiante pendant 30 min.

- ✓ Faire sortir les souchiers secondaires préparé préalablement (souches de références) du Frigo pour les mettre à une température ambiante pendant 30 min.
- ✓ Prendre une jeune colonie de souche de référence pour la mettre dans un tube qui contient 10 ml TSE.
- ✓ Agiter au vortex jusqu'à l'homogénéisation de la solution.

- ✓ Faire des dilutions décimales en transférant 1 ml de la solution mère dans 09 ml de TSE stérile, bien mélanger au vortex puis refaire l'opération pour avoir une dilution supérieure et jusqu'à avoir 10 dilutions pour chaque souche
- ✓ De chaque dilution de chaque souche, transférer 0.1 ml sur une boîte de gélose nutritive et l'ensemencer en stries serrés sur la surface de la gélose nutritive.
- ✓ Incuber chaque boîte de gélose nutritive à 35°C pendant 24 heures et stocker les tubes des différentes dilutions au frigo entre 2-8°C pendant 18-24 heures pour les utiliser dans la validation de la méthode d'analyse.
- ✓ Faire la lecture des boîtes après une incubation de 18-24 heures, puis retirer du frigo les tubes correspondants à la charge  $10^2$  UFC d E. coli et de  $10^3$  UFC pour les autres souches.
- ✓ Mettre les tubes à utiliser à une température ambiante pendant 30 min avant leurs utilisations dans la validation de la méthode d'analyse de MONTELUKAST 10 mg.

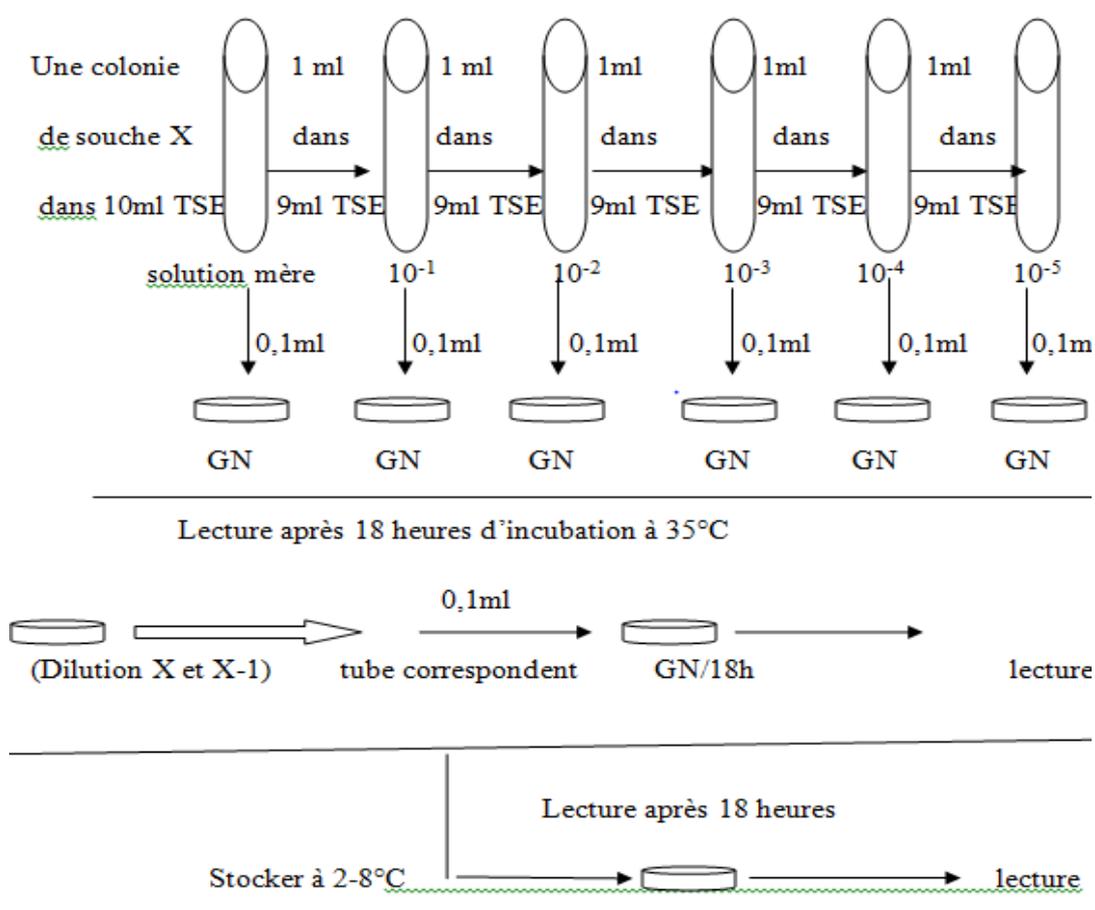


Figure 2 : la méthode de calibration des souches pour effectuer une validation microbiologique.

Dilution X-1 : c'est la dilution qui donne 10-100 UFC/0,1ml (l'équivalent de 100-1000 UFC/ml).

Dilution X: c'est la dilution inferieur qui donne l'équivalent de 1000-10000 UFC/ml).

### 13. Préparation de l'échantillon

Solution 1 : dissoudre 10 g de MONTELUKAST dans 90 ml de TSE.

- Repartitionner l'échantillon dans des tubes en versant 10 ml dans chaque tube.

#### ➤ DGAT

1. Pour le contrôle positif, l'équivalent de  $10^3$ UFC/g de chaque souche de référence séparément selon le paramètre recherché à chaque échantillon puis homogénéiser au vortex.
- 2.ensemencer en profondeur 1 ml de chaque échantillon avec 15à 20 ml de milieu de culture TSA pour les DGAT.
3. L'ensemencement est réalisé en double (2 boites pour chaque ensemencement).
4. Incuber les boites TSA pour le DGAT à 33°C pendant 3 jours.

#### ➤ DMLT

1. Pour le contrôle positif, l'équivalent de  $10^3$ UFC de chaque souche de référence séparément selon le paramètre recherché à chaque échantillon puis homogénéiser au vortex.
- 2.ensemencer en profondeur 1 ml de chaque échantillon avec 15 à 20 ml du milieu de culture SDA pour les DMLT.
3. L'ensemencement est réalisé en double (2boites pour chaque ensemencement).
4. Incuber les boites SDA pour le DMLT à 23°C pendant 5 jours.

#### ➤ Recherche d'*E. Coli*

1. Solution 1.
2. Pour le contrôle positif, ajouter au maximum 100 UFC de la souche de référence *E. coli* à la solution 1 à chaque lot.
3. Transférer 1 ml de chaque lot dans 100ml TSB incubé à 33°C pendant 24h.
4. Transférer 1 ml de chaque lot dans 100ml MCB, incubé à 43°C pendant 24h.
5. Repiquer sur MCA, incubé à 33°C pendant 24-72h.



**Chapitre III:**

**Résultats et**

**Discussion**

### 1. Choix du diluant

Parmi les problèmes rencontrés lors de processus de la validation; le choix de diluant. Celui-ci doit assurer la croissance microbienne des souches recherchées.

Avant d'être capable de choisir le bon diluant, il faut calibrer les souches avant leur utilisation comme il est indiqué précédemment. Après le comptage des colonies effectué sur les boîtes incubées pendant 18 h, on a été capable de sélectionner les boîtes qui contiennent l'équivalent de  $10^3$  UFC /g de chaque souche de référence. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau suivant :

**Tableau 8** : résultats de calibrage des souches de références.

Souches	S.aureus	P.aeruginosa	B.subtilis	C.albicans	A.brasiliensis
La dilution de boîtes sélectionnée	$10^{-4}$	$10^{-6}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$10^{-1}$

#### 1.1. Dénombrement des Germe Aérobie Viable Totale

Après incubation des boîtes de pétries en utilisant le TSE comme diluant et après dénombrement, on a eu les résultats mentionnés dans le tableau suivant.

**Tableau 9** : résultats du Dénombrement des Germe Aérobie Viable Totale en utilisant le TSE.

Souches	<i>S.aureus</i>			<i>P.aeruginosa</i>			<i>B.subtilis</i>			<i>C.albicans</i>			<i>A.brasiliensis</i>		
	BTE 1	BTE 2	M	BTE 1	BTE 2	M	BTE 1	BTE 2	M	BTE 1	BTE 2	M	BTE 1	BTE 2	M
<b>T+</b>	75	75	75	80	80	80	70	70	70	80	80	80	50	50	50
<b>001V</b>	00	00	00	00	00	00	00	00	00	77	75	76	30	34	32
<b>Recouvrement</b>	<b>00 : Non acceptable</b>			<b>00 : Non acceptable</b>			<b>00 : Non Acceptable</b>			<b>0,95 : acceptable</b>			<b>0,64 : Acceptable</b>		

Dans ce cas, on observe une réduction de la croissance microbienne de certains germes, ce qui indique que le MONTELUKAST 10 mg a un effet antimicrobien. Donc il faut neutraliser ou éliminer cet effet par des modifications sur les essais de dénombrements pour garantir la validité des résultats.

## Chapitre 3 : Résultats et discussion

Pour neutraliser ou éliminer cet effet il faut voir la composition de la molécule de MONTELUKAST 10 mg : pour voir s'il y a un composant à effet antimicrobien.

Selon pharmacopée européenne, les agents anti-microbicides sont décrits dans la partie théorique.

Dans notre cas, pour qu'on puisse définir le diluant à effet neutralisant, on a préparé trois échantillons comme suit :

- 1<sup>er</sup> diluant : TSE + thiosulfate.
- 2<sup>eme</sup> diluant : TSE + tween.
- 3<sup>eme</sup> diluant: TSE+ 3% Tween + 0,3 % lécithine.

### ➤ En utilisant le TSE+ Thiosulfate

Les résultats obtenus des essais sur les trois échantillons effectués sur le premier diluant de MONTELUKAST 10 mg pour le dénombrement des germes aérobies viables totaux (DGAT) sont représentés dans les tableaux suivant.

**Tableau10** : résultats du dénombrement des germes aérobies viables totaux en utilisant le TSE+ thiosulfate.

Souches	<i>S.aureus</i>			<i>P.aeruginosa</i>			<i>B.subtilis</i>			<i>C.albicans</i>			<i>A.brasiliensis</i>		
	BTE	BTE	M	BTE	BTE	M	BTE	BTE	M	BTE	BTE	M	BTE	BTE	M
	1	2		1	2		1	2		1	2		1	2	
<b>T+</b>	10	20	15	25	23	24	125	89	107	100	100	100	30	30	30
<b>001V</b>	00	00	00	00	00	00	00	00	00	98	98	98	10	10	10
<b>Recouvrement</b>	<b>00 : Non Acceptable</b>			<b>00 : Non acceptable</b>			<b>00 : Non Acceptable</b>			<b>0,98 : acceptable</b>			<b>0,33 : non acceptable</b>		

les résultats obtenus dans ce tableau, on constate que l'effet microbicide de notre médicament n'est pas maîtrisé, et ce diluant n'est pas valide. Donc il faut refaire les expériences avec un autre diluant.

### ➤ En utilisant le TSE+ Tween

Dans le deuxième cas, on a utilisé le TSE+ tween. Les résultats de ce test sont mentionnés dans le tableau suivant.

## Chapitre 3 : Résultats et discussion

**Tableau 11** : résultats du dénombrement des Germes Aérobie Viables Totaux en utilisant TSE + tween.

Souches	<i>S.aureus</i>			<i>P.aeruginosa</i>			<i>B.subtilis</i>			<i>C.albicans</i>			<i>A.brasiliensis</i>		
	BTE	BTE	M	BTE	BTE	M	BTE	BTE	M	BTE	BTE	M	BTE	BTE	M
	1	2		1	2		1	2		1	2		1	2	
<b>T+</b>	121	200	161	43	21	32	17	11	14	100	100	100	30	30	30
<b>001V</b>	45	57	51	19	79	49	03	01	02	105	93	99	25	25	25
<b>Recouvrement</b>	<b>0,31 : non acceptable</b>			<b>1,53 : acceptable</b>			<b>1 ,14 : Acceptable</b>			<b>0,99 : acceptable</b>			<b>0,83 : acceptable</b>		

Dans ce deuxième cas, on constate que les taux de recouvrement ne sont pas tous acceptables, ce qui n'est pas conforme aux normes. L'addition du tween n'a pas d'effet neutralisant. Ce qui nécessite l'utilisation d'un autre agent neutralisant.

➤ **En utilisant le TSE+ 3% Tween + 0,3 % lécithine**

L'addition de la lécithine au TSE+ tween a donné les résultats suivants.

**Tableau 12**: résultats du dénombrement des Germes Aérobie Viables Totaux en utilisant TSE+ 3% Tween + 0,3 % lécithine.

Souches	<i>S.aureus</i>			<i>P.aeruginosa</i>			<i>B.subtilis</i>			<i>C.albicans</i>			<i>A.brasiliensis</i>		
	BTE	BTE	M												
	1	2		1	2		1	2		1	2		1	2	
<b>T+</b>	42	39	41	41	43	42	28	29	29	48	50	49	8	9	9
<b>001V</b>	43	43	43	40	50	45	52	48	50	51	51	51	10	11	11
<b>Recouvrement</b>	<b>0,95 : acceptable</b>			<b>0,93 : acceptable</b>			<b>0,58 : Acceptable</b>			<b>0,96 : Acceptable</b>			<b>0,81 : Acceptable</b>		

D'après ce tableau, on remarque que les taux de recouvrements sont dans l'intervalle 0,5- 2, ce qui est conforme aux normes. L'ajout de la lécithine a donné le résultat attendu et l'effet microbicide est bien maîtrisé. On peut conclure que ce diluant est validé.

### 1.2. Dénombrement des moisissures et levures totaux

On a effectué les autres expériences en utilisant le même diluant pour les DMLT ainsi que pour la recherche spécifique d'*E. Coli*. Les résultats de ce dénombrement sont représentés dans le tableau suivant.

**Tableau 13** : résultats du dénombrement des moisissures et levures totaux en utilisant TSE+ 3% Tween + 0,3 % lécithine

Souches	<i>C.albicans</i>			<i>A.brasiliensis</i>		
	M	BTE 1	BTE 2	M	BTE 1	BTE 2
<b>T+</b>	72	72	71	15	15	15
<b>001V</b>	69	64	74	25	25	25
<b>Recouvrement</b>	<b>1,04 : acceptable</b>			<b>0,6 : acceptable</b>		

Dans ce tableau, on constate que le taux de recouvrement pour les deux souches *A.brasiliensis* et *C.albicans* est acceptable.

### 1.3. Recherche d'*E. coli*

La recherche spécifique d'*E. coli* est réalisée sur milieu MAC a donné les résultats ci-dessous.

**Tableau 14**: résultats du dénombrement d'*Escherichia coli* en utilisant TSE+ 3% Tween + 0,3 % lécithine.

Recherche <i>E. coli</i>	Résultats : croissance des colonies		Conclusion
Tests	Témoin positif	Contrôle positif	
<b>Solutions 1</b>	Culture négative	Culture négative	Satisfaisant

L'incubation d'*E. Coli* sur ce milieu montre l'absence de toute poussée de la souche d'intérêt.

On a refait ces essais sur les trois paramètres DGAT, DMLT, *E. coli* sans contamination artificielle afin de vérifier la qualité microbiologique du même lot du médicament, et pour calculer l'ajustement D. Les résultats de ces essais sont représentés dans les tableaux suivants.

**Tableau 15:** résultats du dénombrement des germes aérobies viables totaux pour l'essai (E).

	001V		
Dénombrement	BTE 1	BTE 2	M
Résultats	00	00	00

**Tableau16:** résultats du dénombrement des levures et moisissures totaux pour l'essai (E).

	001V		
Dénombrement	BTE 1	BTE 2	M
Résultat	00	00	00

Pour la recherche spécifique, on n'a pas eu de poussée bactérienne (*E. coli* : absence /g).

Compte-tenu des résultats précédents, on peut confirmer que les résultats des différents dénombrements sont dus aux contaminations par les souches de références et ce ne sont pas des faux positifs.

### 2. Validation microbiologique des trois lots de médicament

Après avoir validé le diluant, on a refait les mêmes étapes sur les trois lots (contrôle positif, témoin positif, essai, témoin négatif) en utilisant le diluant TSE+ 3% Tween + 0,3 % lécithine.

#### 2.1. Validation du premier lot

La validation microbiologique du premier lot en utilisant les différentes souches de références a donné les résultats suivants.

**Tableau 17** : résultats du dénombrement des Germes Aérobie Viables Totaux pour le premier lot.

DGAT	Souches					Conclusion
	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>	
<b>Boite 1 (C+)</b>	42	41	28	48	8	<b>Satisfaisant</b>
<b>Boite 2 (C+)</b>	39	43	29	50	9	
<b>Moyenne</b>	41	42	29	49	9	
<b>Boite 1 (E)</b>	00	00	00	00	00	
<b>Boite 2 (E)</b>	00	00	00	00	00	
<b>Moyenne</b>	00	00	00	00	00	
<b>Ajustement (C-E)</b>	41	42	50	49	9	
<b>Boite 1 (T+)</b>	43	40	52	51	10	
<b>Boite 2 (T+)</b>	43	50	48	51	11	
<b>Moyenne</b>	43	45	50	51	11	
<b>Recouvrement</b>	0,95	0,93	0,58	0,96	0,81	

Toutes les valeurs du taux de recouvrement varient entre 0,58 et 0,96. On est dans l'intervalle de critères d'acceptation ( $\geq 0,5$  et  $\leq 2$ ) donc les résultats sont conformes.

**Tableau 18** : résultats du dénombrement des Levures et Moisissures Totales pour le premier lot.

<b>DMLT</b>	<b>Souches</b>		<b>Conclusion</b>
	<i>C.albicans</i>	<i>A.brasiliensis</i>	
<b>Germes</b>			
<b>Boite 1 (c+)</b>	72	15	<b>Satisfaisant</b>
<b>Boite2 (c+)</b>	71	15	
<b>Moyenne</b>	72	15	
<b>Boite 1(E)</b>	00	00	
<b>Boite2 (E)</b>	00	00	
<b>Moyenne</b>	00	00	
<b>Ajustement C-E</b>	72	15	
<b>Boite 1(t+)</b>	74	25	
<b>Boite 2(t+)</b>	64	25	
<b>Moyenne</b>	69	25	
<b>Recouvrement</b>	1,04	0,6	

Pour les DMLT, on constate aussi que les résultats sont bien dans l'intervalle des critères d'acceptation.

L'observation des boites de pétri est faite après incubation sur MCA à 33°C pendant 72 heures.

**Tableau 19**: résultats de la recherche d'*E. Coli* pour le premier lot.

<b>Recherche <i>E. coli</i></b>	<b>Résultats : croissance des colonies</b>		<b>Conclusion</b>
<b>Tests</b>	Témoin positif	Contrôle positif	
<b>Solution 1</b>	Culture positive	Culture positive	Satisfaisant

Après incubation, l'observation macroscopique des boites de pétri ne montre aucune poussée microbienne et ce pour le témoin positif et le contrôle positif. On peut dire que ces résultats sont conformes aux normes et l'analyse du premier lot est validée.

### 2.2. Validation du deuxième lot

On a effectué une validation microbiologique pour le deuxième lot en suivant les mêmes étapes que pour le premier. Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux ci-dessous.

**Tableau 20:** résultats de dénombrement des Germes Aérobie Viabiles Totaux pour le deuxième lot.

DGAT	Souches					Conclusion
Germes	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>	
<b>Boite 1 (C+)</b>	79	24	19	42	22	<b>Satisfaisant</b>
<b>Boite 2 (C+)</b>	83	30	22	72	23	
<b>Moyenne</b>	81	27	21	57	23	
<b>Boite 1 (E)</b>	00	00	00	00	00	
<b>Boite 2 (E)</b>	00	00	00	00	00	
<b>Moyenne</b>	00	00	00	00	00	
<b>Ajustement (C-E)</b>	81	27	21	57	23	
<b>Boite 1 (T+)</b>	91	32	40	58	50	
<b>Boite 2 (T+)</b>	84	35	40	49	30	
<b>Moyenne</b>	88	34	40	54	40	
<b>Recouvrement</b>	0,92	0,79	0,52	1,05	0,57	

D'après les résultats de ce tableau, on peut dire que le critère d'acceptation pour les DGAT est vérifié.

**Tableau 21:** résultats du dénombrement des Levures et Moisissures Totales pour le deuxième lot.

DMLT	Souches		Conclusion
	<i>C.albicans</i>	<i>A.brasiliensis</i>	
<b>Germes</b>			<b>Satisfaisant</b>
<b>Boite 1 (C+)</b>	34	13	
<b>Boite2 (C+)</b>	37	10	
<b>Moyenne</b>	36	12	
<b>Boite 1(E)</b>	00	00	
<b>Boite2 (E)</b>	00	00	
<b>Moyenne</b>	00	00	
<b>Ajustement C-E</b>	36	12	
<b>Boite 1(t+)</b>	23	16	
<b>Boite 2(t+)</b>	31	16	
<b>Moyenne</b>	27	16	
<b>Recouvrement</b>	1,33	0,75	

Ce tableau montre que le taux de recouvrement de *candida albicans* est égale à 1,33 et pour *aspergillus basiliens* est égale à 0,75, les deux valeurs sont comprises dans l'intervalle de critère d'acceptation donc les résultats des DMLT sont satisfaisantes.

**Tableau 22 :** résultats de la recherche d'*E. coli* pour le deuxième lot.

Recherche <i>E. coli</i>	Résultats : croissance des colonies		Conclusion
Tests	Témoin positif	Contrôle positif	
<b>Solutions 1</b>	Culture positive	Culture positive	Satisfaisant

Ce tableau montre que les résultats de la recherche d'*Escherichia coli* sont conformes à la spécification préétablie par pharmacopée européenne. Donc le deuxième lot est conforme aux normes.

### 2.3. Validation du troisième lot

Après avoir validé les deux premiers lots on a passé à valider le troisième lot et ce pour répondre au critère répétabilité et pouvoir confirmer que notre médicament MONTELUKAST 10 mg est

conforme aux normes. Les résultats de cette validation microbiologique sont représentés ci-dessous.

**Tableau 23** : résultats du dénombrement des Germes Aérobie Viables Totaux pour le troisième lot.

DGAT	Souches					Conclusion
	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>	
<b>Boîte 1 (C+)</b>	56	25	36	41	20	<b>Satisfaisant</b>
<b>Boîte 2 (C+)</b>	61	41	35	39	24	
<b>Moyenne</b>	59	33	36	40	22	
<b>Boîte 1 (E)</b>	00	00	00	00	00	
<b>Boîte 2 (E)</b>	00	00	00	00	00	
<b>Moyenne</b>	00	00	00	00	00	
<b>Ajustement (C-E)</b>	59	33	36	40	22	
<b>Boîte 1 (T+)</b>	91	32	40	58	50	
<b>Boîte 2 (T+)</b>	84	35	40	49	35	
<b>Moyenne</b>	88	34	40	54	43	
<b>Recouvrement</b>	0,67	0,97	0,9	0,74	0,51	

D'après les résultats présentés dans ce tableau on constate que toutes les valeurs calculées sont dans l'intervalle de critère d'acceptation.

**Tableau 24** : résultats du dénombrement des Levures et Moisissures Totales pour le troisième lot.

DMLT	Souches		Conclusion
	<i>C.albicans</i>	<i>A.brasiliensis</i>	
<b>Germes</b>			<b>Satisfaisant</b>
<b>Boite 1 (C+)</b>	34	13	
<b>Boite2 (C+)</b>	27	10	
<b>Moyenne</b>	31	12	
<b>Boite 1(E)</b>	00	00	
<b>Boite2 (E)</b>	00	00	
<b>Moyenne</b>	00	00	
<b>Ajustement (C-E)</b>	31	12	
<b>Boite 1(t+)</b>	23	16	
<b>Boite 2(t+)</b>	31	16	
<b>Moyenne</b>	27	16	
<b>Recouvrement</b>	1,14	0,75	

Ce tableau représente les résultats du calcul de critères d'acceptation pour les DMLT. On constate que les valeurs obtenues sont conformes aux normes de la pharmacopée.

**Tableau 25** : résultats de la recherche d'*E. Coli* pour le troisième lot.

Recherche <i>E. coli</i>	Résultats : croissance des colonies		Conclusion
Tests	Témoin positif	Contrôle positif	
<b>Solutions 1</b>	Culture positive	Culture positive	Satisfaisant

Ce tableau montre que les résultats de la recherche d'*E. Coli* sont satisfaisants. Donc le troisième lot est validé.

D'après ces résultats on peut conclure que MONTELUKAST 10 mg comprimés pelliculés a été traité selon les recommandations de la pharmacopée européenne 9.2<sup>ème</sup> édition, chapitre 2.6.12, 2.6.13 et 5.1.4 est donc valide et il peut être commercialisé en toute sécurité.

# Conclusion

## Conclusion générale et perspectives

---

### Conclusion

La validation des procédures analytiques est aujourd'hui un principe accepté et utilisé dans tous les domaines d'activité générateurs de résultats de mesures.

La validation est généralement l'étape ultime du développement d'une nouvelle méthode analytique avant son application en analyse de routine. Basée sur des exigences scientifiques et réglementaires, elle doit permettre d'évaluer les performances de la méthode par l'étude d'un certain nombre de paramètres appelés « critères de validation » au moyen d'outils statistiques appropriés.

Cependant, bien que ce principe soit reconnu comme indispensable à la gestion de la qualité dans l'industrie pharmaceutique, son application pratique n'est pas toujours aisée.

Le cas de la validation d'une méthode d'analyse microbiologique dans le laboratoire de contrôle qualité de LDM groupe, illustre la mise en place de cette méthodologie de validation.

Dans une première étape, des analyses microbiologiques ont été effectuées sur différents milieux après contamination de MONTELUKAST 10mg comprimé pelliculé avec des souches de référence. Les milieux utilisés sont SDA pour le dénombrement des moisissures et des levures totaux, le TSA pour le dénombrement des germes aérobies totaux et MacConKey Agar pour *E. coli*.

Après l'incubation de l'échantillon dilué dans le TSE sur les différents milieux, les résultats du dénombrement montrent que les taux de recouvrement ne sont pas dans l'intervalle d'acceptation et que le médicament a un effet antibactérien sur les souches de références.

Afin de neutraliser cet effet, différentes solutions ont été utilisées. Le diluant TSE avec 3% de tween 80 et 0,3% lécithine a permis de mettre en évidence une contamination du produit par les souches de références utilisées. Cette solution a été donc retenue comme celle compatible avec les spécifications du produit.

Compte tenu des résultats de cette validation, les essais et les spécifications réalisées à libération sont les suivants :

## Conclusion générale et perspectives

---

- Dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) : à la dilution aux 1/10 spécifications  $\leq 10^3$ UFC/g.
- Dénombrement des levures et moisissures (DMLT) : à la dilution aux 1/10 spécifications  $\leq 10^2$ UFC/g.
- Recherche *E-coli* : avec la solution 1 spécification absence /g.

**Références**

**Bibliographiques**

## Références bibliographiques

---

Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé(ANSM). 2014. Bonne Pratiques de Fabrication, Version /1 bis.

Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé(ANSM). 2012. Disponible sur : < [http://ansm.sante.fr/Activites/Pharmacopee/Qu-est-ce-que-la-Pharmacopee/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/Activites/Pharmacopee/Qu-est-ce-que-la-Pharmacopee/(offset)/0) >.

-Albert, L., Cœur, A., Lespagnol, C., et Lesieur, D. 1974. Chimie des médicaments. Tome 1, Edition Maloine, Paris, p. 234-324-403.

Anonyme1, [http:// www.pharmacologie.ubordeaux2.fr/Enseignement/documents/poly\\_Pharmacologie\\_générale](http://www.pharmacologie.ubordeaux2.fr/Enseignement/documents/poly_Pharmacologie_générale).

Anonyme 2.1996. Encyclopédie médicale pratique, CD-ROM.

Anonyme3. 1997. Pharmacie, Documentation juridique 2ème Edition, Alger, pp. 258.

-Anonyme4. 1998. Assurance de qualité des produits pharmaceutiques, volume 1.Genève : OMS, pp. 1-2.

- Auray, S. 2004. Groupe poly m2, entretien sanitaire haute technologie. Procédures de nettoyage des surfaces d'environnements pharmaceutiques A3P Canada,Novembre

- Barbereau , S. 2006 La contrefaçon des médicaments : un phénomène en pleine expansion. Med Trop; 66 : 529-32.

-Bolzan ,C. 2008. La validation de nettoyage en industrie pharmaceutique : validation des prérequis. Principe et application au cas particulier d'une centrale de pesées. Thèse de doctorate. Université henripoincare – NANCY 1. Faculté pharmacie.

-Bonnes pratiques de fabrication Ministère du travail. 2014. publié en mars, de l'emploi et de la santé, N°2014/1bis.

-Clémence, T.2014. Thèse N°082. Validation des procédés de fabrication : nouvelles réglementations FDA-EMA et application industrielle de la vérification en continue des procédés, p.8.

-Code of Federal Regulations. 2004. – Parts 210 and211.FDA<http://www.fda.gov/cder/dmpq/cgmpregs.htm>.

- Feinberg, M., Laurentie, M. 2006. a global approach to method validation and measurement uncertainty. Accreditation and Quality Assurance. 11, 3–9.
- Fetterolf, D.M. 2007. Developing a Sound Process Validation Strategy. BioPharm International. Vol. 20, 12, p. 6.
- Guidance for Industry. 1998. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies, (Draft guidance), U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER).
- HARPREET, K., GURPREET, S., NIMRATA, S. 2013.PHARMACEUTICAL Process validation: areview. Journalof drug delivery therapeuticsVOL.3.N°4.pp.189-194.
- Helali, a. 1994. Pharmacologie fondamentale et clinique à l'usage des étudiants en médecine. ENAG, Alger, P. 13-56 et 146-147.
- International Conference on Harmonization. 2010. History. [En ligne] 2010. [Citation : 11 07 2010.] <http://www.ich.org>.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2000. Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical: Q7.
- « ISO 8402.1994. - Management de la qualité et assurance de la qualité -- Vocabulaire», ISO. [Enligne].Disponiblesur: [http://www.iso.org/iso/fr/catalogue\\_detail.htm?csnumber=2015](http://www.iso.org/iso/fr/catalogue_detail.htm?csnumber=2015). [Consulté le: 27- août-2016].
- ISO17025.2005.
- « ISO 9000.2015. - Systèmes de management de la qualité – Principes essentieltvocabulaire», ISO.[Enligne].Disponiblesur: [http://www.iso.org/iso/fr/catalogue\\_detail?csnumber=45481](http://www.iso.org/iso/fr/catalogue_detail?csnumber=45481). [Consulté le: 27-août- 2016].
- Juran JM. 1983. Gestion de la qualité. AFNOR Paris La Défense ,517 p.
- KOPP–KUBEL S. 1998. Good Manufacturing Pratices (GMP) in Pharmaceutical Production. OMS Genève,P45-47.
- La réglementation des médicaments dans l’union européenne. 1998. bonne pratique de fabrication. Médicament à usage humains et médicament vétérinaire édition, vol.4.

## Références bibliographiques

---

- LE HIR, A.1997. Pharmacie galénique Bonnes pratiques de fabrication des médicaments Masson éditeur, France, P35-39.
- Marcel ,G. A et Garnier, M. 1987. Le médicament de l'an 2000, Edition, Masson, Paris, pp.5-33.
- Mathieu, S., Del cerro, C., NOTIS, M. H. 1996. Gérer et assurer la qualité, AFNOR, 6e édition, p.703.
- Mode d'emploi - Milieux en flacons prêts à l'emploi. 2008. Diagnostic Systems TSB.
- Moulin, M., Coqurel, A.2002. Pharmacologie connaissance et pratique. Masson, Paris, P.11 et 37.
- NF EN ISO 17025.2005, Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais, ISO, Genève.
- Note for guidance on validation of analytical procedures: Text and methodology. ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. CPMP/ICH/381/95.
- Pharmacopée européenne .2009. Chapitre 2.6.12 : contrôles microbiologiques des produits non stériles.. 9,2ème édition.
- Pharmacopée européenne.2009. Chapitre 2.6.13 : contrôles microbiologiques des produits non stériles.. 9,2ème édition.
- Pharmacopée européenne.2009.chapitre 5.1.4 : qualification microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles 9,2ème édition.
- Raynaud, M.2011. VALIDATION DU PROCEDE DE FABRICATION DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE, thèse N° APPLIQUEE AUX FORMES SOLIDES ORALES.
- Règles de Bonnes Pratiques de Fabrication de médicaments en petites quantités.2009. Ph. Helv. p. 93-108.
- Scriban, R.1999. Biotechnologie Tec & Doc. 5èmeEdition, Paris, pp. 927.

## Références bibliographiques

---

- Shadle, P. 2004. Qualification of raw materials for biopharmaceutical uses. BioPharm International.
- SHOALB ALAM. 2003. Pharmaceutical process.in: NASH ROBERT. A; WACHTER Alfred .H .pharmaceutical process validation,Third Edition ,New York: marcel DEKKER INC.
- Sliwinski, F.1995.Le nettoyage. Un élément majeur de l'assurance qualité : techniques et validation. Th D Pharm. Lille.
- Sussland (W.- A.). 1996. Le manager, la qualité et les normes ISO, Press polytechniques et universitaires romandes, pp. 185.
- Talbert,M ;Willoquet,G et Labayle ,D.2001.guide pharmaco,edition Lamare,France .pp,25-44.
- Tangri0, P., Rawat Prakash,S., Jakhmola,V., Laksh, M. 2012. Validation: a critical parameter for quality control of pharmaceuticals. Review article. Journal of Drug Delivery & Therapeutics, 2(3): 34-40.15may.
- Vadeville, P. 1983. Gestion et contrôle de la qualité, Association Française de normalisation, Edition Masson, Paris, pp. 134.
- VARSHNEY. P., SHAM .M ., PATEL .P., et *al.*, 2013.different aspects involved in process validation ,INNOVARE Journal of science.

### **Annexe 1 : définitions**

#### **Définition 1 : la pharmacopée**

Une pharmacopée est définie comme une norme pharmaceutique et est un ouvrage réglementaire destiné aux professionnels de santé qui définit :

- Les critères de pureté des matières premières ou des préparations entrant dans la fabrication des médicaments (à usage humain et vétérinaire) voire leur contenant,
- Les méthodes d'analyses à utiliser pour en assurer leur contrôle.

L'ensemble des critères permettant d'assurer un contrôle de la qualité optimale est regroupé et publié sous forme de monographies (ANSM, 2012).

#### **Définition 2 : Bonnes pratiques de fabrication (BPF)**

Les BPF font partie de l'assurance qualité, ces pratiques garantissent que les médicaments sont continuellement produit selon les standards de qualité adéquats, l'usage auquel ils sont destinés, et tels que l'exige l'autorisation officielle de leur mise sur le marché, ils visent à minimiser les risques impliqués dans toute la production pharmaceutique, lesquels ne peuvent être évités qu'en testant le produit fini (LE HIR, .1997).

Il s'agit d'un guide qui doit être obligatoirement suivi, qui est organisé en différents chapitres traitant de la gestion de la qualité, du personnel, des locaux et équipements, de la documentation, de la production, du contrôle de qualité, de la sous-traitance et l'analyse de la fabrication, des réclamations et retrait des produits ainsi que l'auto-inspection.

Les BPF garantissent que les médicaments sont fabriqués selon des normes de qualité et que leur fabrication est documentée et contrôlée (Règles de Bonnes Pratiques de Fabrication de médicaments en petites quantités, 2009); Sans les BPF, on ne peut être sûr que chaque médicament fabriqué à la même qualité que les autres (KOPP–KUBEL S, 1998).

### Definition 3: ICH

Le titre complet de l'ICH est International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. L'harmonisation des exigences réglementaires fut initiée par la Communauté Européenne dans les années 1980, dans le but de développer un marché unique des produits pharmaceutiques. Le succès obtenu en Europe démontra qu'une harmonisation était réalisable. Au même moment, des discussions bilatérales avaient lieu entre l'Europe, le Japon et les Etats-Unis sur des possibilités d'harmonisation. L'ICH fut officielle en Avril 1990 (International Conference on Harmonization, 2010).

### Annexe 2 : préparation des milieux de cultures

#### ➤ TSE +3%de tween + 0,3% de lécithine

- Phosphate monopotassique 3,6 g.
- Phosphate disodiquedihydraté 7.2g équivalant à 0.0067M de phosphate.
- Chlorure de sodium 4,3g.
- Peptone de viande ou de caséine 1,0g.
- Eau purifiée 1000 ml.
- Polysorbate 80 ou le Tween 30g/l
- Lécithine 3 g /l
- Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

#### ➤ TSB

- Peptone pancréatique decaséine 17,0g.
- Peptone papaique de soja 3,0g.
- Chlorure de sodium 5,0 g.
- Phosphate dipotassique 2.5 g.
- Glucose monohydrate 2.5 g.
- Eau purifié 1000ml.

#### ➤ TSA

- Peptone pancréatique decaséine 15.0g.

- Peptone papaique do soja 5.0g.
- Chlorure do sodium 5,0g.
- Gélose 15,0g.
- Eau purifiée 1000ml.

Ajustez le pH pour qu'il soit de  $7,3 \pm 0,2$  à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

### ➤ SDA

- Dextrose 40.0 g.
- Mélange de peptone peptique do tissu animal et de peptone pancréatique de caséine 40,0 g 10,0 g (1 :1).
- Gélose 15,0 g.
- Eau purifié 1000 ml.

Ajustez le pH pour qu'il soit de  $5,6 \pm 0,2$  à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

### ➤ MCB

- Hydrolysat pancréatique de gélatine 20.0 g.
- Lactose monohydraté 10.0 g.
- Bile de bœuf déshydratée 5.0 g.
- Pourpre de bromocrésol 10 mg.
- Eau purifiée 1000 ml.

Ajustez le pH pour qu'il soit de  $7,3 \pm 0,2$  à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

### ➤ MCA

- Hydrolyat pancréatique de gélatine 17,0 g.
- Peptones de viande et de caséine 3,0 g.
- Lactose monohydraté 10,0 g.
- Chlorure de sodium 5,0 g.
- Sels biliaries 1.5 g.
- Gélose 13.5 g.
- Rouge neutre 30.0 mg.

- violet cristallisé 1 mg.
- Eau purifiée 1000 ml.

Ajustez le pH pour qu'il soit de  $7,1 \pm 0,2$  à 25 °C après stérilisation. Portez à ébullition pendant 1 min en agitant constamment, puis stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

**Annexe 3** : les tests impliquer dans la validation.

**-Témoins négatifs** : incubation et ensemencement en l'absence de produit.

**-Témoins positifs** : incubation et ensemencement avec une quantité contrôlée de germes.

**-Contrôle positifs** : incubation et ensemencement avec une quantité contrôlée d'un germe connu et du produit à tester.

**-Essais** : incubation et ensemencement avec le produit à tester.

# Résumé

### Résumé

Le contrôle analytique avant libération d'un médicament sur le marché est une étape importante et nécessaire pour garantir la qualité du produit qui va être délivré aux patients. Les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de prouver que les méthodes utilisées lors de ce contrôle sont parfaitement valides et fiables, en procédant à leur validation. Dans notre travail, nous avons fait une validation d'une méthode d'analyse microbiologique d'un médicament utilisé pour le traitement de l'asthme, MONTELUKAST 10 mg produit par le groupe pharmaceutique LDM. On a effectué un dénombrement sur milieu solide, des germes aérobies viables totaux (DGAT) et des moisissures et des levures totales (DMLT) ainsi qu'une recherche spécifique d'*E. coli* après contamination de l'échantillon par différentes souches de référence en respectant les spécifications selon la pharmacopée européenne qui sont respectivement les suivantes :  $\leq 10^3$  UFC /g,  $\leq 10^2$  UFC/g, Absence /g. Après incubation des boîtes de pétri contenant l'échantillon dilué dans différentes solutions, seule la solution contenant TSE +Tween+ lécithine a donné des résultats qui répondent à la spécification de la pharmacopée européenne. Pour effectuer la validation microbiologique proprement dite, les tests sont réalisés sur trois lots de médicament. Le calcul des taux de recouvrement (moyenne du dénombrement du contrôle positif en présence de produit (c+)/moyenne du dénombrement du témoin positif en l'absence de produit (t+)) montre que toutes les valeurs sont dans l'intervalle d'acceptation qui doit être compris entre 0,50 et 2,00 et ce pour toutes les souches testées. Les résultats trouvés dans ce travail sont conformes pour les 3 lots, on peut donc conclure que la méthode décrite dans ce protocole est validée et que le produit peut être commercialisé en toute sécurité nécessaire pour garantir la santé des consommateurs.

**Mots clés :** qualité, médicament, validation microbiologique, dénombrement, DGAT, DMLT ; *E.coli*

**Abstract**

The analytical control before release of a drug on the market is an important step and necessary to guarantee the quality of the product that will be delivered to patients. Pharmaceutical companies are required to prove that the methods used in this test are perfectly valid and reliable, we did a validation of a microbiological analysis method of a drug used for the treatment of asthma, MONTELUKAS 10mg produced by the pharmaceutical grouped. Solid enumeration, total viable aerobic germs (DGAT), total mold and yeast (TMD), and specific E. coli after contamination of the simple by different reference strains according to the specification according to the European Pharmacopoeia which are respectively:  $\leq 10^3$ UFC / g,  $\leq 10^2$ UFC / g, Absence / g. After incubation of Petri dishes containing the diluted sample in different solutions, only the solution containing TSE +Tween and TSE + Tween+ lecithin gave results that meet the specification of the European Pharmacopoeia. To carry out the microbiological validation itself, the tests are carried out on three batches of medicine. Calculation of recovery rates (means of position control count in the presence of product (t+)) shows that all values are in the acceptance range which must be between 0,50 and 2, 00 and this for all the strains tested. The results found in this work are consistent for the 3 lots, so it can be concluded that the method described in this protocol is validated and that the product can be marketed in any safety necessary to ensure the health of consumers.

Key words: quality, drug, microbiological validation, enumeration, ETAG, EYTM; E. coli.

## ملخص

تعتبر المراقبة التحليلية قبل اطلاق الدواء في السوق خطوة مهمة و ضرورية لضمان جودة المنتج الذي سيتم تسليمه للمرضى يجب على الشركات الدوائية ان تثبت بان الطرق المستخدمة في هذا الاختبار صحيحة وموثوقة تماما من خلال التحقق من صحتها ؛ في عملنا قمنا باجراء التحقق من طريقة التحليل الميكروبيولوجي لعقار يستخدم لعلاج الربو وهو منتيلكاست 10 ملغ ؛ التي تنتجها مجموعة الادوية م ت م و لقد قمنا بالإحصاء على وسط صلب لمجموع الجراثيم الهوائية الكلية الحية ( ج ه ك ح ) مجموع العفن و الخميرة الكلية (ع خ ك ) و البحث الخاص عن ايشريشيا القولون (ا القولون ) بعد تلوين العينة بعدة انواع من السلالات المرجعية تبعا للمواصفات المذكورة في دستور الادوية الاوروبي وهي على التوالي:  $10^3$  وحدة مشكلة لمستعمرة\غ ؛  $10^2$  وحدة مشكلة لمستعمرة\غ ؛ غير موجود\غ و بعد حضن علب بيتري التي تحوي العينة المخففة في وجود مذيبات مختلفة فقط ت س ا +توين + ليسيتين اعطى النتائج التي تتوافق والمواصفات المقررة في دستور الادوية وللتحقق الميكروبيولوجي من صحة طريقة التحليل نفسها يتم اجراء الاختبارات ثلاثة دفعات حساب نسبة التغطية بين كل القيم موجودة داخل مجال القبول تتراوح بين 2 و 0,5 وهذا بالنسبة لجميع السلالات المختبرة النتائج المتحصل عليها خلال هذا العمل متناسقة مع الثلاث دفعات ولذا يمكن استنتاج ان الطريقة المتبعة موثوقة وانه يمكن تسويق المنتج ظروف امنية تضمن صحة المستهلكين

الكلمات المفتاحية : جودة ؛ دواء ؛ التحقق الميكروبيولوجي ؛ احصاء ؛ ج ه ك ح ؛ ع خ ك ؛ ا القولون

<b>CHABANE Karima</b>	<b>Date de soutenance :27/06/2018</b>
<b>SAHLI Saoussen</b>	
<b>Thème : Validation microbiologique d'une méthode d'analyse d'un médicament</b> Cas de MONTELUKAST 10mg	
<b>Département : Biologie Appliquée</b> <b>Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master</b> <b>Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie</b> <b>Filière : Sciences Biologiques</b> <b>Spécialité : Bioindustrie Analyse et Contrôle</b>	
<b>Résumé</b> Le contrôle analytique avant libération d'un médicament sur le marché est une étape importante et nécessaire pour garantir la qualité du produit qui va être délivré aux patients. Les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de prouver que les méthodes utilisées lors de ce contrôle sont parfaitement valides et fiables, en procédant à leur validation. Dans notre travail, nous avons fait une validation d'une méthode d'analyse microbiologique d'un médicament utilisé pour le traitement de l'asthme, MONTELUKAST 10 mg produit par le groupe pharmaceutique LDM. On a effectué un dénombrement sur milieu solide, des germes aérobies viables totaux (DGAT) et des moisissures et des levures totales (DMLT) ainsi qu'une recherche spécifique d'E. coli après contamination de l'échantillon par différentes souches de référence en respectant les spécifications selon la pharmacopée européenne qui sont respectivement les suivant : $\leq 10^3$ UFC /g, $\leq 10^2$ UFC/g, Absence /g. Après incubation des boîtes de pétri contenant l'échantillon dilué dans différentes solutions, seule la solution contenant le TSE+Tween et TSE +Tween+ lécithine a donné des résultats qui répondent à la spécification de la pharmacopée européenne. Pour effectuer la validation microbiologique proprement dite, les tests sont réalisés sur trois lots de médicament. Le calcul des taux de recouvrement (moyenne du dénombrement du contrôle positif en présence de produit (c+)/moyenne du dénombrement du témoin positif en l'absence de produit (t+)) montre que toutes les valeurs sont dans l'intervalle d'acceptation qui doit être compris entre 0,50 et 2,00 et ce pour toutes les souches testées. Les résultats trouvés dans ce travail sont conformes pour les 3 lots, on peut donc conclure que la méthode décrite dans ce protocole est validée et que le produit peut être commercialisé en toute sécurité nécessaire pour garantir la santé des consommateurs.	
<b>Mots clés : qualité, médicament, validation microbiologique, dénombrement, DGAT, DMLT ; E. coli</b>	
<b>Laboratoire : contrôle de qualité groupe LDM</b>	
<b>Président de jury : Mr. KACEM CHAUCHE.N</b>	<b>PROF.UFM. Constantine 1</b>
<b>Rapporteur : Mme. BENCHIHEUB. M</b>	<b>M.C.B. UFM. Constantine 1</b>
<b>Examineur: Mme. CHOUARFA .F</b>	<b>M.A.A. UFM. Constantine 1</b>
<b>Maitre de stage : Mr. LEBSIR. N</b>	<b>MICROBIOLOGISTE LDM. groupe</b>