



Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée



Mémoire

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

Par : AOUAG Seif Eddine
YOUCEF Zakaria

Thème

Validation d'une méthode d'analyse microbiologique du médicament « AMLODIPINE + VALSARTAN LDM[®] 10+160 mg » dans le laboratoire pharmaceutique LDM.

Jury d'évaluation :

Président: Pr.Nouredine KACEM CHAOUECHE

UFM. Constantine 1.

Rapporteur : Dr Amira GHERBOUDJ

UFM. Constantine 1.

Examineur: Dr Aicha MADI

UFM. Constantine 1.

Maitre de stage : Mlle Kenza MIMOUNI

Laboratoire LDM.

DÉDICACE

Je dédie ce modeste travail

A toute ma famille

Mes parents

Mes frères, Said, Khireddine, Mohamed et Houda

A tous mes amis

Amine, Raouf,

A toute ma promotion de B.A.C

A tous les analystes du laboratoire

Kenza, Feriel

Houcine, Aissa, Noreddine, Nasreddine, Mostapha

Inas, Oumaima, Hadjer, Yasmine

Abd el Wadoud, Zakaria, Adel, Toufik, Abdel ghani

Amira, Karamelle, Nessrine, Samira

Yassine, les deux Walid

etHind

...Seif Eddine

DÉDICACE

Je dédie ce modeste travail

A toute ma famille

*Ma mère mon père « Qu'Allah lui fasse miséricorde et
fasse de sa demeure le paradis »*

Mes frères, mes sœurs, mes neveux et mes nièces

A tous mes amis

Amine, Mounir, Yasser, Djaber

A toute ma promotion de B.A.C

A tous les analystes du laboratoire

Kenza, Ferial

Houcine, Aissa, Noredine, Nasreddine, Mostapha

Inas, Oumaima, Hadjer, Yasmine

Abd el Wadoud, Zakaria, Adel, Toufik, Abdel ghani

Amira, Karamelle, Nessrine, Samira

Yassine, les deux Walid

etHind

REMERCIEMENTS

Avant tout nous remercions Dieu le Tout Puissant qui a eu la bonté de nous garder jusqu'à ce jour si spécial et nous permettre de faire part à la communauté scientifique cette modeste contribution.

Ensuite, tout le remerciement et la gratitude envers Mme **GHERBOUDJ AMIRA**, Docteur à l'université de Mentouri pour ses précieuses orientations pour surpasser les obstacles méthodologiques, ainsi qu'aux lectures répétées dans le but d'obtenir une parfaite finalisation de notre travail.

Nous remercions également Madame **BENCHAIB Ferial** "Chef laboratoire contrôle qualité", Mlle **MIMOUNI KENZA** Chef Microbiologie pour leur collaboration en nous fournissant des données précises sur le contrôle qualité.

Un remerciement particulier au professeur **Nouredine KACEM CHAOUECHE** qui a accepté de présider le jury.

Aussi, Dr. **Aicha Madi**, nous vous remercions d'avoir accepté d'examiner et de critiquer ce modeste travail.

Résumé

La nécessité fondamentale pour l'accès aux médicaments fiables et sans danger constitue un droit inaliénable de tout citoyen. En partant de ce principe que l'OMS a fait de la qualité, la sécurité et l'efficacité des médicaments le fondement de sa stratégie thérapeutique. Or, le médicament est un produit d'une rare complexité, qui pour être bénéfique au patient, exige dans sa conception, sa fabrication, sa manipulation et son usage des précautions extrêmement rigoureuses.

Ainsi, la politique des agences réglementaires régissant ce domaine a pu évoluer d'une manière exponentielle avec l'accroissement du besoin, les autorités mondiales de santé ont et depuis 1962 exigé certaines normes et mesures afin de sécuriser au maximum ce secteur. C'est dans ce contexte que la validation d'une méthode d'analyse microbiologique de produit pharmaceutique a été introduite, afin de maîtriser, démontrer et documenter qu'un médicament peut être fabriqué de façon fiable et répétitive par des procédés déterminés.

Dans cette étude, nous avons établi un état de l'art dans lequel nous avons abordé, les définitions des différents types des Paramètres à maîtriser dans l'industrie pharmaceutique, et l'importance impact de la microbiologie dans la qualité d'un médicament. Et afin d'obtenir un produit d'une bonne qualité microbiologique on a montré les paramètres de la validation (analyse qualitative, analyse quantitative, performances d'une méthode microbiologique selon les conditions d'exécution de l'essai...). Afin de démontrer que la méthode de validation adoptée convient pour l'usage auquel elle est destinée, on a pris comme exemple à étudier le médicament : AMLODIPINE + VALSARTAN LDM[®] 10+ 160 mg. La validation de la méthode d'analyse microbiologique a certainement pu d'abord sécuriser la qualité pharmaceutique d'AMLODIPINE + VALSARTAN LDM[®] et aussi elle nous a permis d'établir un protocole de contrôle microbiologique du médicament AMLODIPINE + VALSARTAN LDM.

Mots clés : qualité, microbiologique, validation, AMLODIPINE + VALSARTAN LDM[®] 10+ 160 mg, LDM.

summary

The fundamental need for access to safe and reliable medicines is an inalienable right of every citizen. Based on this principle that WHO has made quality, safety and efficacy of medicines the foundation of its therapeutic strategy.

However, the medicine is a product of rare complexity, which to be beneficial to the patient, requires in its design, manufacture, handling and use of extremely rigorous precautions.

Thus, the policy of the regulatory agencies regulating this field has been able to evolve exponentially with the increase of the need, the world authorities of health have and since 1962 demanded certain norms and measures in order to secure the sector as much as possible.

It is in this context that the validation of microbiological analysis of a pharmaceutical product has been introduced, in order to control, demonstrate and document that a medicine can be manufactured reliably and repetitively by specific methods.

In this study, we have established a bibliographic synthesis in which we have addressed, the definitions of the different types of Parameters to be mastered in the pharmaceutical industry, and the importance impact of microbiology in the quality of a medicine.

And in order to obtain a product of good microbiological quality, it has been shown the parameters of the validation (qualitative analysis, quantitative analysis, performance of a microbiological method according to the conditions of execution of the test, etc.).

In order to demonstrate that the adopted validation method is appropriate for its intended use, the following example was used to study the medicine: AMLODIPINE + VALSARTAN LDM® 10+ 160 mg.

The validation of the microbiological analysis method was certainly able to first secure the pharmaceutical quality of AMLODIPINE + VALSARTAN LDM® and also allowed us to establish a microbiological control protocol for the drug AMLODIPINE + VALSARTAN LDM.

Key words: quality, microbiological, , AMLODIPINE + VALSARTAN LDM® 10+ 160 mg, LDM.

ملخص

إن للمواطن الحق الكامل في الحصول على أدوية آمنة موثوقة. فاستناداً على هذا المبدأ، فإن منظمة الصحة العالمية قد جعلت جودة الأدوية، سلامتها وفعاليتها أساس الإستراتيجية العلاجية. ومع ذلك، فإن الدواء هو نتاج تركيبة جد معقدة، فحتى يصبح ذو منفعة للمريض، فإنه يتطلب في تصميمه وتصنيعه الأخذ باحتياجات صارمة للغاية. وهكذا، فإن سياسة الوكالات التنظيمية التي تنظم هذا المجال قد تمكنت من التطور بشكل طردي مع زيادة الحاجة للأدوية، فقد أخذت أنظمة الصحة العالمية ومنذ عام 1962 بعض المعايير والتدابير من أجل تأمين القطاع قدر الإمكان. وتماشياً مع ما ذكر، فقد أضافت المنظمة ما يعرف بمصطلح التحقق من الفعالية الميكروبيولوجية للمنتج الصيدلاني، قصد مراقبة الدواء والتوثيق على إمكانية تصنيعه وإعادة تصنيعه بطرق محددة.

إن الشطر الأول من هذه الدراسة يحتوي على تعريفات لعدة طرق مستعملة في صناعة المنتجات الصيدلانية، وأثر المراقبة الميكروبيولوجية في التأثير على جودتها.

إضافة إلى عدة معايير كالتحليل النوعي، التحليل الكمي، الفعالية الميكروبيولوجية وفقاً لشروط تنفيذ الاختبار، إلخ. فبغية التحقق من فعالية الطريقة المعتمدة، تم تطبيقها على AMLODIPINE + VALSARTAN LDM® 10+ 160 mg. إن التحقق من صحة طريقة التحليل الميكروبيولوجي كان بالتأكيد قادراً على ضمان الجودة الصيدلانية للدواء المذكور أعلاه، كما سمح لنا أيضاً بإنشاء بروتوكول تحكم ميكروبيولوجي للدواء AMLODIPINE + VALSARTAN LDM وذلك عند تكرار تصنيعه.

الكلمات المفتاحية: النوعية، الميكروبيولوجية، فاعلية املوديبيبنفاسارتان 10+160 مغ .

Table des matières

Remercîments et Dédicaces.....	
Résumé.....	
Table des matières	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux.....	
Liste des abréviations.....	
Introduction Générale	

CHAPITRE I

1. Généralités sur les médicaments.....	3
1.1 Médicament	3
1.2 Matière première.....	3
1.2.1 Principe actif.....	3
1.2.2 Excipient.....	3
1.3. Produit fini.....	3
1.4. Générique.....	4
2. Paramètres à maîtriser dans l'industrie pharmaceutique.....	4
2. 1. Qualité d'un médicament.....	4
2.2. Contrôle Qualité	4
2.3. Contrôle microbiologique.....	4
2.4. Système d'assurance qualité pharmaceutique	5
2.5. Bonnes pratiques de fabrication	6
2.6. Cinq M.....	6
2.7. Système documentaire	6
2.8. ICH	7
3. Validation dans l'industrie pharmaceutique.....	7
3.1. Définition :.....	8
3.2. Types de validations.....	8
3.2.1. Validation prospective.....	8
3.2.2. Validation concomitante ou simultanée	9

3.2.3 Validation rétrospective.....	9
3.2.4 Revalidation	9
4. Validation des méthodes d'analyses microbiologiques	10
4.1. Selon la Pharmacopée Européen 9 ^{ème} édition.....	10
4.2. Contamination microbienne des produits non stériles.....	10
4.3. Paramètres de validation d'une méthode	11
4.3.1. Critères de performances d'une méthode microbiologique.....	11
4.3.1.1. Limite de détection de la méthode.....	12
4.3.1.2.Limites de quantification de la méthode.....	12
4.3.1.3.Fidélité	12
4.3.1.4.Autres critères de performances d'une méthode qualitative.....	13
4.4. Contamination bactérienne.....	13
4.5. Contamination microbienne d'un produit pharmaceutique	14
4.5.1. Principaux microorganismes d'importance dans l'industrie.....	14
5. Contrôle qualité des méthodes microbiologiques	14
5.1. Gestion des échantillons	14
5.2. Contrôle qualité du matériel de contrôle	15
5.3. Contrôle qualité des colorants	16
5.4 . Souches Utilisées Pour Validation	16
5.4.1. Pseudomonas aeruginosa	16
5.4.2. Staphylococcus aureus	16
5.4.3. Bacillus subtilis	17
5.4.4. Candida albicans	17
5.4.5. Aspergillus brasiliensis	18
5.4.6. Escherichia-coli.....	18
5.4.7. Salmonella	18
6. Médicament Amlodipine Valsartan.....	19
6.1. Qu'est-ce qu'Amlodipine Valsartan ?.....	19
6.2. Dans quel cas Amlodipine Valsartan est-il utilisé?.....	19
6.3. Comment Amlodipine Valsartan est-il utilisé?.....	19
6.4. Comment Amlodipine Valsartan agit-il?.....	20
6.5. Quelles études ont été menées sur Amlodipine Valsartan ?.....	20
6.6. Quel est le bénéfice démontré par Amlodipine Valsartan au cours des études?.....	21

6.7. Quel est le risque associé à l'utilisation d'Amlodipine Valsartan?	21
6.8. Pourquoi Amlodipine Valsartan a-t-il été approuvé?	22

CHAPITRE II

1. Paramètres de recherche microbiologiques exigés pour Amlodipine Valsartan LDM®	24
1.1. Dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT).....	24
1.2. Dénombrement des moisissures/levures totales (DMLT)	24
1.3. Recherches spécifiques	25
2. Equipement Du Laboratoire	25
2.1. Matériel.....	25
2.2. Appareillage.....	25
2.3. Echantillonnages.....	28
3. Milieux De Culture.....	29
3.1. Solution tampon peptonée de chlorure de sodium ph 7,0 (TSE+ 0,5% Tween 80)	29
3.2. Milieu liquide aux peptones decaséine et de soja (TSB).....	30
3.3. Milieu gélosé aux peptones do caséine et do soja (TSA)	30
3.4. Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé (SDA).....	31
3.5. Milieu liquide de MacConkey (MCB).....	31
3.6. Milieu gélosé de MacConkey (MCA)	32
3.7. Milieu liquide d'enrichissement pour les salmonelles Rappaport-Vassiliadis (RVB) ..	32
3.8. Milieu gélosé xylose-lysine-désoxycholate (XLD)	33
3.9. Milieu gélosé-cétrimide	34
3.10. Milieu gélosé mannitol-sel (Chapman)	35

CHAPITRE III

1. Introduction.....	38
2. Site d'étude	38
2.1. Coordonnées	38
2.2. Les activités de fabrication de produits pharmaceutiques autorisées et réalisées sur le site :.....	39
2.3. Les différents compartiments de l'industrie LDM	42
3. Produits et environnement du travail	42
3.1. Produit à étudier.....	42
3.2 Matériels et équipements	43
3.3 Réactifs et Milieux de culture.....	43

3.4 Souche de références	44
3.5. Paramètres de validation.....	45
3.6. Plan de travail	45
4. Calibration des souches	46
4.1. Protocole de validation	46
4.1.1. calibration de la charge microbienne de chaque souche de référence	46
5. Mode opératoire	48
5.1. Préparation de l'échantillon.....	48
5.2. Dénombrement Des Germes Aérobie Mésophile Viables Totaux « DGAT »	49
5.3. Dénombrement Des Germes Aérobie Levures et Moisissures Totales « DMLT »	49
5.4. Recherche spécifique	50
5.4.1. Recherche <i>Escherichia coli</i>	50
5.4.2. Recherche de <i>Salmonella</i>	50
5.4.3. Recherche <i>Staphylococcus aureus</i>	51
5.4.4. Recherche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
5.5. Identification des germes spécifique (coloration de GRAM).....	51
5.5.1. Technique de la coloration de Gram.....	52
6. Résultats Et Interprétations	53
6.1. Dénombrement des germes aérobies mésophiles viables totaux DGAT	53
6.2. Dénombrement des levures et moisissures totales	57
6.3. Recherche <i>Escherichia coli</i>	60
6.4. Recherche <i>Salmonella</i>	61
6.5. Recherche <i>Staphylococcus aureus</i>	62
6.6. Recherche <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
Conclusion Générale.....	
Référence	
Annexe.....	

Liste des figures

Figure 1 : Concept de qualité totale.	5
Figure 2: Hotte à flux laminaire.	26
Figure 3: incubateur.	26
Figure 4: compteur de colonie.....	27
Figure 5: agitateur vortex.	27
Figure 6: bain-marie.	28
Figure 7: la boîte de Amlodipine + Valsartan LDM [®]	29
Figure 8: Amlodipine + Valsartan LDM [®] blister.....	29
Figure 9 : Carte représentative du site géographique de l'industrie pharmaceutique LDM.....	39
Figure 10: logo LDM groupe.....	39
Figure 11: les étapes de la coloration de GRAM.	52
Figure 12: Photographie microscopique -coloration de GRAM-.....	60
Figure 13: Photographie microscopique -coloration de GRAM-.....	61
Figure 14: Photographie microscopique -coloration de GRAM-.....	62
Figure 15: Photographie microscopique -coloration de GRAM.....	63

Liste des tableaux

Tableau 1: les lots utilisée et son DDF et DDP.....	28
Tableau 2: les bouillant utilisé pour la validation.	36
Tableau 3: les milieux gélosé utilisé pour la validation.	36
Tableau 4: les médicament qui produisée par LDM	41
Tableau 5: Informations sur AMLODIPINE+VALSARTAN LDM®	43
Tableau 6: les lots utilisé pour la validation.....	43
Tableau 7: Paramètres de validation.	45
Tableau 8 : plan de travail	45
Tableau 9: résultats de DGAT 1 ^{ier} Essai(lot 7438).....	54
Tableau 10: Résultat de DGAT 2 ^{ème} Essai (lot 6360).....	55
Tableau 11: Résultat de DGAT 3 ^{ème} Essai (lot 6361).	56
Tableau 12: taux de recouvrement pour la recherche DGAT (lot 7438, 6360, 6361).....	56
Tableau 13: résultat de DLMT 1 ^{ier} Essai (lot 7438).....	58
Tableau 14: résultat de DLMT 2 ^{ème} Essai : lot 6360.....	58
Tableau 15: résultat de DLMT 3 ^{ème} Essai : lot 6361	59
Tableau 16: taux de recouvrement pour la recherche DMLT (lot 7438, 6360, 6361).	59
Tableau 17: Résultat de la recherche <i>Escherichia coli</i> lots 7438, 6360,6361.....	60
Tableau 18: Résultat de la recherche <i>Salmonella</i> lots 7438, 6360,6361.....	61
Tableau 19: Résultat de la recherche <i>Staphylococcus aureus</i> lots 7438, 6360,6361.....	62
Tableau 20: Résultat de la recherche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lots 7438, 6360,6361.....	63

Liste des Abréviation

°C :Degré Celsius.

AFSSAPS:l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé.

ATNC:Agents Transmissibles Non Conventionnel.

BPF:Bonnes Pratiques de Fabrication.

Cp : Comprimé.

CQ:Contrôle Qualité.

D : L'ajustement.

DCI :Dénomination Commune Internationale.

DDF : Date De Fabrication.

DDP : Date De Péréemption.

DGAT :Dénombrement Des Germes Aérobie Total.

DMLT : Dénombrement Des Moisissures/Levures Totales.

E- : Essai négatif.

E+ : Essai positif.

EMA: European Medicine Agency.

F : Taux de recouvrement.

FDA: Food and Drug Administration.

g :Gramme.

h :Heures.

ICH:International Conference on Harmonization.

IPC : Control In Process.

ISO:Organisation internationale de normalisation.

LDM:Laboratoire de Diagnostic Magrébins.

MCA : Milieu gélosé de MacConkey.

MCB :MacConkey Bouillon.

MO: Micro-Organism.

MP: Matière première.

NPP : Le Nombre le Plus Probable.

OMS:Organisation Mondiale de la Santé.

PCB : polychlorobiphényles

PF:Produit Fini.

Ph euro 9^{ème}:Pharmacopée Européenne.

Ph : Potentiel Hydrogène.

RVB : Le Bouillon Rappaport-Vassiliadis Soja.

SDA : La Gélose De Sabouraud Dextrose.

T- : Témoin Négatif.

T+ : Témoin Positif.

TSA : La Gélose Trypto-Caséine Soja.

TSB : Trypto-Caséine Soja Bouillon.

TSE : Solution Tampon Peptonée De Chlorure De Sodium.

UFC : Unité Formant Colonie.

XLD : Xylose-Lysine-Désoxycholate La Gélose.

Introduction générale

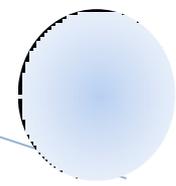
Le développement d'un médicament est un procédé long, impliquant la découverte de la molécule active, les essais laboratoires, les études sur l'animal, les essais cliniques et les enregistrements réglementaires. Afin d'améliorer l'efficacité et la sécurité du médicament après sa mise sur le marché, les agences réglementaires exigent que le médicament soit testé sur son identité, son dosage, sa qualité, sa pureté et sa stabilité avant libération. Les fabricants de médicaments sont donc dans l'obligation de démontrer qu'ils contrôlent les aspects critiques de leurs opérations spécifiques. Pour cette raison, la validation pharmaceutique et les contrôles de procédé sont importants. Mais la validation n'est pas seulement un exercice réglementaire, elle représente également un des principaux outils de l'assurance qualité, permettant de construire la qualité du produit et d'en conserver les standards, depuis sa conception jusqu'à la fin de sa commercialisation. C'est aussi une démarche de progrès qui, par une meilleure connaissance et une meilleure maîtrise des procédés, permet une diminution des coûts de production et de contrôle.

La validation est l'expression complète d'une séquence d'activités ayant pour but de démontrer et documenter qu'un médicament peut être fabriqué de façon fiable par des procédés déterminés, avec une qualité appropriée pour leur utilisation destinée. Les contrôles en cours de procédé et l'analyse à libération seuls ne sont pas suffisants pour assurer cette qualité, par conséquent tous les facteurs qui pourraient affecter la qualité de produit doivent être correctement conçus et démontrés pour fonctionner efficacement. La validation est la preuve qu'un procédé fonctionne : elle doit être effectuée en utilisant des principes scientifiques, afin d'établir la capacité du procédé et de confirmer l'acceptabilité du médicament (**Raynaud, 2011**).

A tort et pendant fort longtemps, la validation analytique a été dissociée du procédé de fabrication et considéré comme moins important que le reste du procédé. Par contre à l'heure actuelle, dans notre société, le contrôle de qualité devient de plus en plus fréquent et les exigences sur les résultats rendus sont de plus en plus importantes. Il suffit de considérer les domaines où interviennent les résultats des méthodes de dosage pour s'en rendre compte : développement et contrôle de qualité des médicaments, détermination de paramètres de biologie clinique, analyses toxicologiques et médico-légales, contrôles antidopage, analyses de dioxines et de polychlorobiphényles (PCB), d'additifs dans les aliments, etc.

Au cours de stage de fin d'études dans LDM. Nous avons effectué une validation d'une méthode d'analyse microbiologique, dont le premier chapitre présente une synthèse bibliographique qui discute des généralités sur le médicament et sa validation. Le deuxième chapitre comporte une partie sur le matériel et les méthodes et le troisième renferme les résultats du travail au laboratoire et ses discussions.

CHAPITRE I :
ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE



1. Généralités sur les médicaments

1.1. Médicament

Un médicament est toute substance possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal, ou pouvant leur être administrée en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique (**Gaignault, 1982 ; Durant et Le Jeune, 2017**).

1.2. Matière première

Les matières premières sont des substances actives, excipients et éléments de mise en forme pharmaceutique destinés à être utilisés ou administrés chez l'homme ou l'animal (**Husson, 2011**).

1.2.1. Principe actif

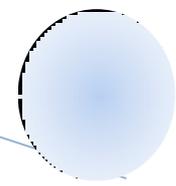
Le principe actif d'un médicament est une substance d'origine chimique ou naturelle caractérisée par un mécanisme d'action curatif ou préventif précis dans l'organisme. C'est une substance active douée de propriétés pharmacologiques, et est donc à la base de l'effet thérapeutique (**Talbert et al, 2001**).

1.2.2. Excipient

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

1.3. Produit fini

C'est un médicament qui possède un nom commercial, qui a fait l'objet d'un enregistrement auprès des autorités de santé, qui est préparé industriellement selon des normes très strictes (les bonnes pratiques de fabrication) et est vendu par un laboratoire pharmaceutique. Sous son même nom de marque, il existe différentes formes pharmaceutiques et différents conditionnements. Chacun faisant l'objet d'un enregistrement spécifique et restera protégée



tant qu'elle fera l'objet d'une propriété intellectuelle et d'une protection des droits intellectuels et/ou commerciaux (brevet, exclusivité commerciale, licence). Une fois la propriété intellectuelle perdue (épuisement des droits du ou des brevets), le médicament peut être commercialisé sous des formes dites génériques (**Chast, 2016**)

1.4. Générique

C'est une copie conforme du médicament de référence ou "princeps". Le médicament générique, peut être fabriqué et commercialisé sous un nom différent par des laboratoires pharmaceutiques agréés. Le médicament générique répond aux mêmes critères de qualité et de sécurité que les produits de référence et est contrôlé par agence nationale de la sécurité du médicament et des produits (l'AFSSAPS). Dans un médicament générique on peut changer les excipients selon les besoins du laboratoire (**Ansm, 2016**)

2. Paramètres à maîtriser dans l'industrie pharmaceutique

2.1. Qualité d'un médicament

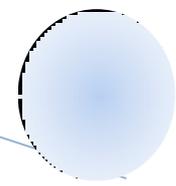
Selon la norme ISO, la qualité d'un médicament est l'ensemble des caractéristiques d'une entité qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés et implicites (**WHO, 2016**)

2.2. Contrôle Qualité

Le guide des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) définit le contrôle de la qualité comme étant la vérification ou le contrôle de la conformité aux spécifications. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) le définit de façon plus détaillée comme étant toute mesure prise incluant la mise au point de spécifications, l'échantillonnage, l'analyse, et le traitement des données analytiques (**Holloway, 2004**)

2.3. Contrôle microbiologique

Les contrôles microbiologiques doivent permettre de garantir une bonne qualité hygiénique et marchande du produit fabriqué et minimisent les pertes dues aux mauvaises conditions de fabrication (**Scriban, 1999**). Les essais microbiologiques ont été conçus pour le dénombrement des bactéries mésophiles, des moisissures et des levures capables de croître en aérobiose. Ces essais sont en premier lieu destinés à déterminer si un produit faisant l'objet d'une monographie de la pharmacopée satisfait aux exigences microbiologiques spécifiées dans cette monographie. Le choix de la méthode est déterminé par des facteurs, tels que la nature du produit et le nombre de microorganismes présumé. Quelle que soit la méthode choisie, elle doit être convenablement validée (**Ph. Eur.9^{ème}, 2017**)



Ils concernent :

1. Contrôles microbiologiques
 - De MP, excipient, PF.
 - Des fluides : eau, azote, air comprimé, vapeur.
2. Contrôles environnement des zones stériles pendant la répartition.
3. Contrôles de stérilité des produits finis.
4. Contrôles et identification des micro-organismes.

Les échantillons doivent être conservés conformément aux prescriptions de la législation en vigueur et ou du demandeur d'analyse. Les échantillons doivent être conservés en quantité suffisante pour permettre de refaire au moins 2 analyses. Les échantillons sont conservés dans leurs emballages définitifs.

2.4. Système d'assurance qualité pharmaceutique

La personne qualifiée de l'établissement de fabrication doit fabriquer les médicaments adaptés à l'usage auquel ils sont destinés, conformes aux exigences de l'autorisation de mise sur le marché ou à l'autorisation de l'essai clinique, selon le cas, et qui n'exposent pas le patient à des risques dus à une sécurité, qualité ou efficacité insuffisante. L'atteinte de cet objectif de qualité engage la responsabilité de la direction et requiert la participation et l'engagement du personnel des différents départements à tous les niveaux de l'entreprise, de ses fournisseurs et distributeurs, intégrant les concepts fondamentaux de la gestion de la qualité des bonnes pratiques de fabrication(BPF) (Ansm, 2013). Cette constatation a donné naissance au concept de « Qualité totale » et schématisé dans la figure 1.

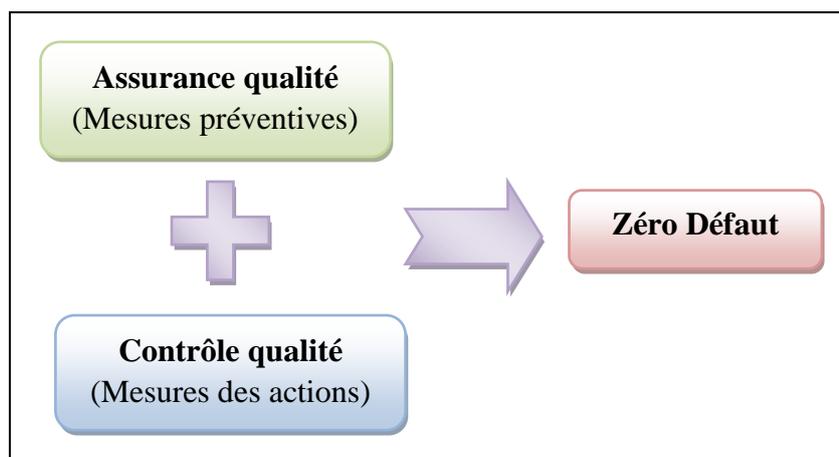
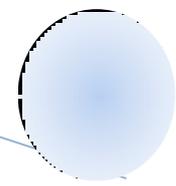


Figure 1 : Concept de qualité totale.



2.5. Bonnes pratiques de fabrication

Les bonnes pratiques de fabrication (BPF) s'appliquent aux étapes du cycle de vie depuis la fabrication des médicaments expérimentaux, le transfert de technologie, la fabrication commerciale jusqu'à l'arrêt du produit. Cependant, le système qualité pharmaceutique peut s'étendre à l'étape du développement pharmaceutique comme décrit dans la ligne directrice International Conference on Harmonisation (**ICH Q10, 2013**) qui tout en étant optionnelle, devrait faciliter l'innovation et l'amélioration continue et renforcer le lien entre le développement pharmaceutique et les activités de fabrication.

2.6. Cinq M

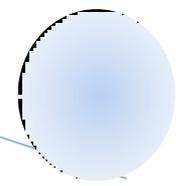
Pour éviter les risques de non qualité qui peuvent survenir en cours de fabrication et de conditionnement et ainsi maîtriser la qualité, il est mis en place selon les BPF la règle des 5M dont la qualification fait partie intégrante. L'observance de cette règle vise à garantir la qualité, la sécurité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

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

2.7. Système documentaire

La documentation est un élément essentiel du système d'assurance de la qualité, elle permet de retracer l'historique d'un lot (**Lanoux, 2003**). Un bon système-qualité repose sur un manuel documentaire efficace, dont le système documentaire permet de s'assurer que :

- Tous ce qui doit être fait est décrit (procédures, modes opératoires, consignesetc.);
- Ce qui est écrit est effectivement réalisé ;
- Tout ce qui a été réalisé est enregistré sur un support approprié.

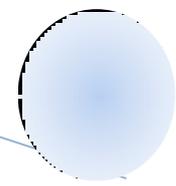


2.8. ICH

Le titrecomplet de l'ICH est International Conference on Harmonization 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**)

3. Validation dans l'industrie pharmaceutique

L'industrie pharmaceutique utilise des matériaux chers, des installations et des équipements sophistiqués et du personnel qualifié. L'utilisation efficace de ces ressources est nécessaire pour le succès continu de l'industrie : il ne serait pas possible d'utiliser les équipements sans savoir s'ils produiront le médicament ayant les qualités requises. Les industries pharmaceutiques sont donc concernées par la validation, pour l'assurance de la qualité, la réduction des coûts et les autorités réglementaires. De plus, une étude détaillée, un contrôle du procédé de fabrication et une validation sont nécessaires pour diminuer les échecs et augmenter la productivité. Plus précisément, la validation du procédé de fabrication permet de fournir la preuve écrite que le procédé (dans les paramètres de conception indiqués) est capable, avec répétabilité, d'assurer la production d'un médicament de qualité exigée. Il est admis que la validation de procédé doit être achevée avant la commercialisation du produit fini (validation prospective). Dans le cas où cela n'est pas possible, il peut être nécessaire de valider le procédé pendant la production de routine (validation concomitante). Les procédés qui ont déjà été utilisés pendant un certain temps sans aucun changement significatif, peuvent aussi être validés selon un protocole approuvé (validation rétrospective). (**Raynaud, 2011**) Toutes ces méthodes de validation sont décrites dans le chapitre 2.



3.1. Définition

Selon La FDA (Food and Drug Administration) et les BPFs, la validation est l'établissement de la preuve que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés. La validation est donc un exercice documenté, au cours duquel on peut démontrer que chaque étape d'un procédé se déroulera comme prévu initialement, c'est-à-dire :

- Aux procédés de production et de nettoyage.
- Aux systèmes informatisés.
- Aux équipements, dans ce cas, le terme qualification sera employé.
- Aux méthodes d'analyse.

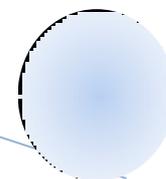
Pour les industries pharmaceutiques, la validation est tout d'abord une exigence réglementaire. Bien qu'il n'existe pas de description précise étape par étape, des Guidelines sont publiées par l'European Medicine Agency (EMA), la Food and Drug Administration (FDA), ou encore les Pharmacopées pour définir les responsabilités relatives à la validation.

Mais la validation est également un outil fondamental des entreprises. Elle leur permet d'avoir confiance dans la qualité des produits fabriqués. Par la maîtrise du procédé qu'elle apporte, la validation réduit la variabilité inter lots et minimise les effets liés au hasard. Cela assure l'obtention de produits de la même qualité, sûrs et efficaces comme elle réduit les risques de rappels de lots ou de réclamations clients. Bien que coûteuse au départ, la validation permet aux entreprises d'optimiser les dépenses en limitant les incidents en cours de production et les non-conformités lors des contrôles et donc en diminuant les coûts liés aux rejets, retraits, resettes ou investigations.

3.2. Types de validations

3.2.1. Validation prospective

La validation prospective est la plus recommandée du point de vue réglementaire, c'est également l'approche privilégiée par les entreprises, car elle est plus sûre. Elle repose sur les données recueillies d'après un protocole défini et se déroule au début d'un projet, avant l'utilisation en routine d'un procédé.



3.2.2. Validation concomitante ou simultanée

Exceptionnellement, lorsque la validation prospective n'est pas réalisable, on peut procéder à une validation simultanée. Ce choix de validation doit être justifié, documenté et approuvé par les personnes responsables. Les données sont alors recueillies au cours de l'exécution réelle et répétée d'un procédé. Elles seront ensuite évaluées pour permettre la validation. Les exigences documentaires sont les mêmes que pour la validation prospective. En outre, un protocole définissant les informations à collecter doit être rédigé.

3.2.3 Validation rétrospective

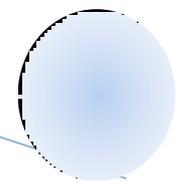
Une validation rétrospective peut être réalisée sur un procédé utilisé depuis longtemps et pour lequel la validation n'a jamais été réalisée. Elle permet alors une mise en conformité avec les exigences réglementaires. Une analyse rigoureuse des données expérimentales accumulées au cours des fabrications et contrôles précédents doit être faite. Cependant, ce type de validation n'est valable que sur un système, un procédé ou un équipement qui n'a jamais été l'objet de modifications, même mineures.

En absence d'une documentation précise sur les interventions pratiquées, on ne peut donc pas connaître avec certitude la période couverte par la validation rétrospective. En principe, et lorsque cela est possible, elle doit être évitée pour les essais analytiques. Une évaluation rétrospective des valeurs de nombreux essais peut être réalisée si les numéros de lot, les modifications éventuelles des paramètres du test, du matériel ou des techniciens ont bien été documentés. Si les informations sont disponibles, la validation rétrospective de l'essai peut être réalisée.

3.2.4 Revalidation

Une fois la validation réalisée, le système ou le procédé est considéré comme maîtrisé tant qu'aucune modification significative ne survient. C'est-à-dire qu'en cas de changement une revalidation devra être entreprise. Dans le cas des méthodes analytiques, la revalidation permet de s'assurer que les critères de performance de la méthode sont toujours atteints. L'ICH donne des exemples de situations dans lesquelles une revalidation peut être nécessaire pour une méthode analytique, parmi ces cas on peut citer :

- Le cas de changement dans la synthèse de la substance médicamenteuse.
- Le cas de modification de la composition du produit fini.
- Le cas de changement dans la procédure d'analyse.



L'étendue de la revalidation dépendra de la nature du changement. Une évaluation doit également être planifiée de façon périodique afin de s'assurer que les procédés restent maîtrisés et évaluer la nécessité, ou non, d'une revalidation. Concernant les méthodes analytiques, le fabricant doit s'assurer que la méthode reste maîtrisée et adaptée à l'utilisation. Il peut être intéressant pour le fabricant de prendre en compte de nouvelles méthodes d'analyse qui peuvent apporter une plus grande assurance de la qualité du produit. **(Renaud, 2016)**

4. Validation des méthodes d'analyses microbiologiques

Une validation d'analyse microbiologique dite l'applicabilité des méthodes microbiologique selon la pharmacopée européenne, est une contamination artificielle du produit non stérile, afin de s'assurer que la méthode du contrôle microbiologique sera applicable ce produit. **(PMEII/UNOP, 2013)**

4.1. Selon la Pharmacopée Européen 9^{ème} édition

La validation des méthodes d'analyses microbiologiques doit se faire dans le laboratoire d'exécution. La validation implique 4 sortes de tests :

- ✓ **Témoins négatifs** : incubation et ensemencement en l'absence de produit.
- ✓ **Témoins positifs** : incubation et ensemencement avec une quantité contrôlée de germes.
- ✓ **Essais positifs** : incubation et ensemencement avec une quantité contrôlée d'un germe connu et du produit à tester.
- ✓ **Essais négatifs** : incubation et ensemencement avec le produit à tester.

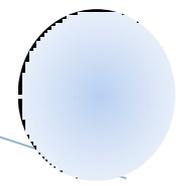
4.2. Contamination microbienne des produits non stériles

Médicaments non à base de plantes

Dénombrement de la bio charge en bactéries aérobies et en moisissures.

Le test est simple : une préparation réalisée dans un bouillon est ensemencée sur des géloses TSA (enrichi à la trypto caséine de soja) pour dénombrer les bactéries aérobies, et sur des géloses de milieu Sabouraud pour dénombrer les moisissures.

- Avant de réaliser cette analyse, il convient de diluer la préparation initiale de sorte que les colonies à dénombrer sur les géloses TSA et Sabouraud soient ni trop nombreuse ni trop peu présentes.



- Le test n'est validé qu'à partir du moment où il est garanti que les analyses ont été valides à partir du moment où il est garanti que les analyses ont été effectuées dans un environnement non contaminé, que des substances interférentes n'ont pas perturbé la croissance bactérienne et que les géloses utilisées favorisaient bien la croissance.

Les trois indicateurs qui doivent être contrôlés lors de la validation sont :

- 1. La propreté de l'environnement** est vérifiée à chaque manipulation sous PSM (poste de sécurité microbiologique).
- 2. Les qualités nutritives des géloses** sont éprouvées par des tests de fertilité.
- 3. La présence potentielle d'agents interférents** également appelés inhibiteurs intrinsèques, est éliminée en utilisant des neutralisants.

La détermination de la contamination par des germes spécifiés (une préparation initiale du produit à tester dans un bouillon est diluée dans d'autres bouillons favorisant la croissance de l'un des germes recherchés avant d'être ensemencée sur des géloses spécifiques comme les géloses Cetrinides ou XLD). (PMEII/UNOP, 2013)

4.3. Paramètres de validation d'une méthode

La validation est déterminée par la question de base que pose la méthode

1. Analyse qualitative (décision oui / non)

La question est de savoir si un organisme est présent dans une matrice donnée ou non. Ex : détection de micro-organismes pathogènes

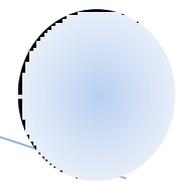
2. Analyse quantitative (en lien avec une limite fixée)

Pour les méthodes destinées à vérifier les limites (limites légales, spécifications), l'effort de validation se concentre au voisinage de la limite en question. La validation des méthodes doit couvrir la teneur d'un micro-organisme sur un vaste domaine ex : le monitoring microbien dans l'environnement. (PMEII/UNOP, 2013)

4.3.1. Critères de performances d'une méthode microbiologique

4.3.1.1. Limite de détection de la méthode

La limite de détection d'une méthode permet de détecter le plus petit signal exprimé en quantité ou concentration, à l'aide d'une méthode d'analyse, avec une fiabilité définie.



L'étude de la limite de détection est basée sur l'analyse statistique de la différence de signaux observés pour les blancs et les échantillons.

- Théoriquement, pour une méthode en microbiologie, il s'agit d'un micro-organisme cible dans le volume d'échantillon analysé.
- La limite de détection est normalement définie dans la méthode de référence normalisée de la pharmacopée.

4.3.1.2. Limites de quantification de la méthode

- **En biologie (ISO 15189)**

La limite de quantification correspond à la plus petite valeur mesurée exprimée en concentration, rendue avec de confiance acceptable et incertitude connue.

- **En microbiologie**

Les limites de quantification d'une méthode sont les concentrations la plus basse et la plus élevée, correspondant au nombre de colonies isolées d'un volume donné d'échantillon, qui dénombrées sur une seule membrane ou gélose, à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie et qui constitue la zone quantifiable d'une méthode.

➤ **La limite supérieure** de quantification est la valeur au-delà de laquelle la fiabilité d'un dénombrement sur une seule membrane ou gélose à l'aide d'un volume déterminé d'échantillon est affectée par des facteurs incontrôlables.

➤ **La limite inférieure** de quantification est la valeur en deca de laquelle l'erreur anticipée devient trop grande par rapport au nombre de colonies dénombrées.

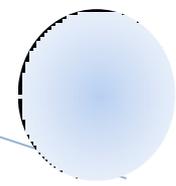
4.3.1.3. Fidélité

La fidélité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises (n=10 tests) dans des conditions déterminées.

- Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de **réplicabilité**, de **répétabilité** ou de **reproductibilité** pour une méthode.

➤ **Répétabilité**

La répétabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenue pour le même échantillon soumis à l'essai dans **le même laboratoire et dans les mêmes conditions** : même technicien, même lot de réactifs, même



instrument, même lot de milieu de culture, même incubateur, même jour d'analyse (délai le plus court possible).

L'objectif est de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument / réactif) et caractériser la meilleure performance.

➤ **Reproductibilité**

La reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus pour le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes : opérateur différent, système de mesure différent, etc.

Cette donnée n'est disponible que si le laboratoire participe à des essais inter-laboratoire pour une méthode identique et un même échantillon et n'est requise que pour la validation d'une méthode développée par le laboratoire.

4.3.1.4. Autres critères de performances d'une méthode qualitative

La performance d'une méthode d'identification microbiologique peut se mesurer à l'aide de la **sensibilité**, de la **spécificité**, du taux de faux positifs, du taux de faux négatifs et de l'efficacité.

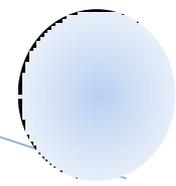
- **Sensibilité** : fraction de tous les résultats positifs correctement identifiée dans le comptage présumé.
- **Spécificité** : fraction de tous les résultats négatifs correctement identifiée dans le comptage présumé.
- **Sélectivité** : caractéristique d'une méthode qui favorise la croissance d'MO recherché tout en retardant la croissance des autres MO n'offrant pas d'intérêt.

4.4. Contamination bactérienne

La contamination bactérienne est facilement détectée par une inspection visuelle d'une culture de bactéries pendant quelques jours si celle-ci a été infectée :

Les cultures infectées apparaissent généralement nuageuses (c'est-à-dire trouble), parfois avec un film mince sur la surface. Une chute soudaine du pH du milieu de culture est également fréquemment rencontrée.

Sous un microscope de faible puissance, les bactéries semblent aussi minuscules, granuleuses entre les cellules en mouvement, et l'observation au microscope de haute puissance peut



résoudre les formes de bactéries individuelles. La contamination bactérienne peut être une infection bactérienne ou d'origine microbienne, mais pas virale. (Aquaportail. 2017)

4.5. Contamination microbienne d'un produit pharmaceutique

La contamination microbienne, contamination d'une matière ou d'un produit par une autre matière ou par un autre produit, peut altérer la qualité d'un médicament et représente donc un risque élevé pour le patient. La contamination microbienne est un sujet de préoccupation des industries pharmaceutiques depuis de nombreuses années. Il l'est aujourd'hui d'autant plus que de nouvelles exigences réglementaires sont récemment entrées en application. (Ph. Eur. 9^{ème}, 2017)

4.5.1. Principaux microorganismes d'importance dans l'industrie

- **Bactérie**

Micrococcus, Staphylococcus, Streptococcus, E.colis, Shigella, Salmonella, Yersinia, Vibrio, Pseudomonas et autres aérobies Gram négatif, Listeria, Brevibacterium, Propionibacterium, Bactéries lactiques, Bifidobactéries, Bacillus Clostridium.

- **Champignons** : Penicillium, Aspergillus, Levures.

- **Risques biologiques** : Virus, ATNC (d'agent transmissible non conventionnel) et prions.

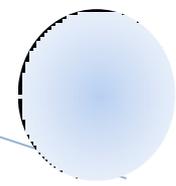
5. Contrôle qualité des méthodes microbiologiques

Les facteurs à maîtriser avant la validation relèvent du système assurance qualité mis en place au laboratoire CQ, Ils regroupent :

- La gestion de l'échantillon
- La compétence du personnel
- La maintenance de l'équipement
- Le matériel de contrôle
- Gestion des colorants, milieux et réactifs
- Conservation des registres

5.1. Gestion des échantillons

Le prélèvement doit être fait dans les meilleures conditions d'asepsie afin d'éviter toute contamination du produit prélevé.



- **Les conditions d'asepsies sont adaptées** à la qualité microbiologique du produit à prélever et la destination du prélèvement.
- **Le conditionnement** recevant le prélèvement doit obligatoirement être stérile ou propre. Par exemple, l'environnement doit être stérile pour un prélèvement sur un produit stérile, il doit être le meilleur possible pour un prélèvement sur un échantillon non stérile.
- **Le transport de l'échantillon au laboratoire** s'effectue dans les délais les plus courts, pour ne pas influencer sur sa qualité microbiologique.

Les prélèvements pour lesquels la contamination microbienne peut se développer rapidement doivent être transportés à froid dans un conditionnement à température contrôlée

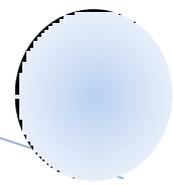
5.2. Contrôle qualité du matériel de contrôle

Différents types de contrôles sont utilisés :

- Contrôles incorporés dans le kit
 - Contrôle similaires à l'échantillon
 - Culture de collection
- **En générale**
- Ils sont analysés comme les échantillons
 - Utiliser un contrôle positif et négatif
 - Inclure un contrôle faiblement positif pour les procédures immunologiques
 - Choisir des contrôles positifs proches des valeurs limites
 - S'assurer que les milieux, les réactifs et les consommables fonctionnent comme prévu
- **Culture de collection**
- Souches de référence : **ATCC (USA), NTCC (UK), CIP (IPP)**
 - Souches (maison)
- **Contrôle qualité des souches**

Approprié pour des souches particulières :

- Vérification avec des organismes connus
- Analyser pour vérifier si précipitation ou cristaux
- Analyser si contaminants tels que bactéries et champignons



5.3. Contrôle qualité des colorants

Gestion et contrôle des colorants

- Procédure établie pour les préparer ou les reconstituer
- Etiquette : contenu, concentration, initiales, date de préparation et de la première utilisation, de péremption initiale du préparateur
- Stockage approprié. (PMEII/UNOP, 2013).

5.4. Souches Utilisées Pour Validation

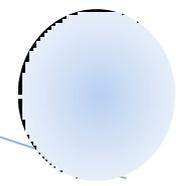
5.4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Les bacilles du genre *Pseudomonas* sont des bactéries en forme de bâtonnets droits ou courbés, à Gram négatif, à oxydase positive, et strictement aérobies, bien que dans certains cas, elles peuvent utiliser le nitrate comme accepteur d'électrons. Certains membres du genre *Pseudomonas sp* sont psychrophiliques, tandis que d'autres synthétisent des sidérophores fluorescentes de couleur jaune-vert. Les espèces *Pseudomonas* ont en commun la présence de plasmides et ne forment pas de spores. L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à mobilité unipolaire avec un aspect nacré et secrète une variété de pigments comme la piocyanine (cyan), la fluorescéine (jaune-vert fluorescent) et piorubine (rouge brunâtre).

Elle est souvent pathogène et responsable, chez l'Humain, d'infection-nosocomiale. Effectivement, *Pseudomonas aeruginosa* a été de plus en plus reconnue comme un pathogène opportuniste émergent en pertinence clinique. Plusieurs études épidémiologiques indiquent, en outre, leur résistance aux antibiotiques qui a augmenté à partir d'échantillons cliniques. (Aquaportail, 2017)

5.4.2. *Staphylococcus aureus*

Un staphylocoque distingue une bactérie du genre *Staphylococcus* responsable d'infections dans le sang, caractérisée par une forme coccus, un Gram positif, une coagulase positive pour *S. aureus*, le staphylocoque doré, mais négative pour les autres. Ce sont des bactéries Gram-positives rondes, agencées en forme de raisin, sans formation de spores, sans mouvement actif du groupe de cocci.



Une vingtaine d'espèces de la famille des staphylocoques sont actuellement identifiées, dont l'espèce principale : *Staphylococcus aureus*, un agent pathogène responsable de nombreuses infections humaines et animales.

Les staphylocoques se développent facilement sur presque tous les milieux bactériologiques, dans les cultures leur croissance est meilleure dans le mannitol à teneur moyenne en sel et dans la gélose au sang.

Les bactéries staphylocoques présentent sous la forme de cellules sphériques, de 0,5- 1,5 µm de diamètre, disposées isolément, par paires ou en grappes irrégulières, gram-positives, non mobiles (sans mouvement actif), anaérobies facultatives, chimiorganotrophes, métabolisme énergétique oxydatif et fermentatif, principalement catalase- positif et oxydase négative. La température optimale de croissance et de reproduction 30-37 °C. De nombreuses espèces ont une proportion élevée à prédominante de chaînes d'acides gras ramifiées dans leurs lipides membranaires.

Les staphylocoques pathogènes sont traités par des antibactériens de type pénicilline comme la méticilline (inusitée), l'oxacilline (agent antimicrobien), la flucloxacilline et la dicloxacilline. Les souches multi résistantes sont un problème en raison d'une mauvaise antibiothérapie. (Aquaportail , 2017)

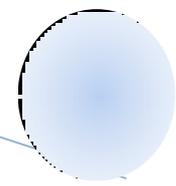
5.4.3. *Bacillus subtilis*

Bacillus est un genre qui regroupe les bacilles à Gram positif, aérobies stricts et anaérobies facultatifs, ils produisent des endospores en présence d'oxygène. Ces bactéries interviennent dans l'azote (cycle de l'azote). (Aquaportail , 2017)

5.4.4. *Candida albicans*

Candida albicans est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre *Candida*. *Candida albicans* est un organisme vivant à l'état naturel dans les muqueuses de l'être humain. On le retrouve dans 80 % de la population, et il n'entraîne habituellement aucune maladie ou symptôme en particulier. C'est un organisme commensal saprophyte.

Au laboratoire médical, la culture en boîte de Pétri des *Candida* donne des colonies qui sont grandes, rondes, de couleur blanche ou crème (*albicans* signifie blanchâtre). (Bennett, R.J. ET A.D. Johnson, 2005)



5.4.5. *Aspergillus brasiliensis*

L'*Aspergillus* est une espèce de champignon, constitué de filaments, présent dans les moisissures. L'*Aspergillus* se retrouve dans le sol, les céréales, les aliments et le compost en décomposition. Leurs spores sont présentes dans l'air et la poussière, et peuvent être ingérés en consommant des fruits. Il existe environ 185 espèces d'*Aspergillus*, qui peuvent être nocifs pour l'être humain, en causant des mycoses, ou l'aspergillose, une infestation des voies respiratoires, potentiellement mortelle. (sante-medecine.journal.des.femmes, 2018)

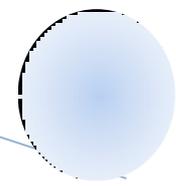
5.4.6. *Escherichia coli*

La bactérie *E. coli* est une abréviation du taxon *Escherichia coli* selon les conventions de nommage des espèces. Considérée par beaucoup comme une super-bactérie, elle est parfois trouvée sous l'appellation de bactérie Ehec ("eh" pour entérohémorragique, une entérobactérie) avec une forme dangereuse pour la santé humaine. La bactérie *E. coli* est à la fois une bactérie commensale et un agent pathogène, autorisant ainsi l'entrée d'autres problèmes médicaux. Certains la classe dans le groupe des super-bactéries. Elle peut générer des conséquences irréversibles, pour des pathologies rénales en particulier, des microbiologistes signalent que certains malades atteints par cette bactériologie spécifique peuvent garder des séquelles assez importantes pour les reins. A ce titre, et en raison du récent développement d'une souche très virulente, elle a été qualifiée de "bactérie tueuse". (Aquaportail, 2017)

5.4.7. *Salmonella*

Une *salmonelle* désigne tout un groupe de bactéries qui causent la fièvre comme la fièvre typhoïde et un certain nombre d'autres maladies, y compris les intoxications alimentaires, la gastro-entérite et des fièvres causées par des produits alimentaires contaminés. L'intoxication s'appelle la salmonellose.

Le genre *Salmonella* est nommé pour le pathologiste américain Daniel Salmon (1850-1914), qui a décrit la maladie de la salmonellose. *Salmonella* est un genre bactérien appartenant à la famille des Entérobactériacées constituée de bacilles Gram négatif intracellulaires anaérobies facultatifs à flagelles péritriches, proche des bacilles parathyphiques, il constitue un groupe important de pathogènes pour les animaux et les humains. Il est composé de trois espèces : *S.bongori*, *S.enterica* et *S.subterranea* dont *S.enterica* (avec 6 sous-espèces)



représente l'espèce la plus pathogène. Elles produisent une toxine qui agit sur le système neurovégétatif et le système lymphoïde de l'intestin. Les salmonelles ne développent pas de capsule (sauf le sérotype *Salmonella Typhi*) ni de spores. Ce sont des bactéries mobiles qui produisent du sulfure d'Hydrogène (H₂S). Elles utilisent le glucose pour avoir une enzyme spécialisée, mais pas le lactose, et elles ne produisent pas d'uréase et n'ont pas non plus de métabolisme de fermentation. C'est un agent producteur de zoonoses de distribution universelle. Il est transmis par contact direct ou contamination croisée lors de la manipulation, à domicile. Certaines salmonelles sont courantes dans la peau des tortues et de nombreux reptiles, ce qui peut être très utile lorsque l'on manipule ces types d'animaux en même temps que de la nourriture. L'habitat naturel des espèces se trouve normalement dans les intestins de tout type d'animal homéotherme (y compris les humains). (Aquaportail , 2017)

6. Médicament Amlodipine Valsartan

6.1. Qu'est-ce qu'Amlodipine Valsartan ?

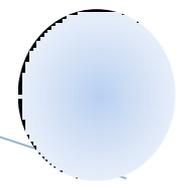
Amlodipine+ Valsartan LDM[®] si le générique de Exforge, qui contient deux principes actifs, l'Amlodipine et le Valsartan. Il est disponible sous la forme de comprimés (5 mg d'Amlodipine et 80 mg de Valsartan ; 5 mg d'Amlodipine et 160 mg de Valsartan ; 10 mg d'Amlodipine et 160 mg de Valsartan).

6.2. Dans quel cas Amlodipine Valsartan est-il utilisé ?

Amlodipine Valsartan est utilisé chez les personnes souffrant d'hypertension (pression artérielle élevée) essentielle qui n'est pas suffisamment contrôlée par l'Amlodipine ou le Valsartan en monothérapie. «Essentielle» signifie que l'hypertension n'a pas de cause évidente. Le médicament n'est délivré que sur ordonnance.

6.3. Comment Amlodipine Valsartan est-il utilisé ?

Amlodipine Valsartan est administré par voie orale à raison d'un comprimé par jour avec un peu d'eau. La dose d'Amlodipine Valsartan LDM à utiliser dépend des doses d'Amlodipine ou de Valsartan prises antérieurement par le patient. Il peut être nécessaire que le patient prenne des comprimés ou des gélules séparément avant de passer au comprimé combinant les deux principes actifs.

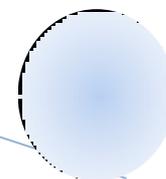


6.4. Comment AmlodipineValsartan agit-il ?

AmlodipineValsartan contient deux principes actifs : l'Amlodipine et le Valsartan. Ces deux principes actifs sont des médicaments antihypertenseurs disponibles séparément depuis le milieu des années 1990 au sein de l'Union européenne (UE). Ils agissent de manière similaire pour réduire la pression artérielle en permettant aux vaisseaux sanguins de se relâcher. La diminution de la pression artérielle permet de réduire les risques associés à une pression artérielle élevée, comme un accident vasculaire cérébral. L'Amlodipine est un inhibiteur calcique. Elle bloque des canaux spéciaux situés à la surface des cellules (canaux calciques), qui laissent normalement entrer les ions calcium dans les cellules. Lorsque les ions calcium s'introduisent dans les cellules des muscles des parois des vaisseaux sanguins, une contraction des vaisseaux se produit. En réduisant l'entrée du calcium dans les cellules, l'Amlodipine empêche les cellules de se contracter, ce qui contribue au relâchement des vaisseaux sanguins. Le Valsartan est un «antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II», ce qui signifie qu'il bloque l'action d'une hormone du corps appelée angiotensine II. L'angiotensine II est un puissant vasoconstricteur (une substance qui diminue le diamètre des vaisseaux sanguins). En bloquant les récepteurs sur lesquels l'angiotensine II se fixe normalement, le Valsartan met fin à l'action de l'hormone, ce qui permet aux vaisseaux sanguins de s'élargir.

6.5. Quelles études ont été menées sur AmlodipineValsartan ?

Étant donné que l'Amlodipine et le Valsartan sont utilisés depuis de nombreuses années, la société a présenté des informations sur ces deux principes, obtenues lors d'études précédentes et issues de la littérature scientifique. Elle a également présenté des données issues des nouvelles études sur l'utilisation des deux principes actifs administrés en association. Cinq études principales incluant près de 5 200 patients souffrant pour la plupart d'hypertension légère à modérée ont été menées. Deux études (portant sur un total de près de 3 200 patients) ont comparé l'Amlodipine, le Valsartan et une association des deux principes à un placebo (traitement fictif). Deux études (portant sur 1 891 patients) ont comparé l'association des deux principes chez des patients dont l'hypertension n'était pas suffisamment contrôlée ni par 10 mg d'Amlodipine, ni par 160 mg de Valsartan. La cinquième étude, de moindre ampleur, a comparé l'association avec celle du lisinopril et de l'hydrochlorothiazide (une autre association d'antihypertenseurs) chez 130 patients souffrant d'hypertension sévère. Dans toutes les études, la diminution de la pression sanguine diastolique (mesure de la pression



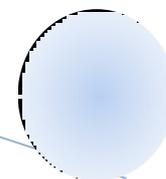
sanguine entre deux battements du cœur) a été le principal critère d'évaluation de l'efficacité du traitement. La pression sanguine a été mesurée en «millimètres de mercure» (mm Hg). La société a également présenté des données montrant que les taux d'Amlodipine et de Valsartan dans le sang étaient identiques chez les patients sous AmlodipineValsartan et chez les patients recevant les deux médicaments séparément.

6.6. Quel est le bénéfice démontré par AmlodipineValsartan au cours des études ?

L'association de l'Amlodipine et du Valsartan s'est avérée plus efficace pour réduire la pression artérielle que le placebo ou le Valsartan ou l'Amlodipine pris seuls. Au cours des études comparant l'association chez des patients recevant déjà soit de l'Amlodipine, soit du Valsartan, la pression sanguine chez les patients sous Valsartan seul avait chuté de 6,6 mm Hg après huit semaines, par rapport à 9,6 et 11,4 mm Hg respectivement chez les patients ayant reçu 5 ou 10 mg d'Amlodipine en plus. Les patients sous Amlodipine seule ont vu leur pression sanguine chuter de 10,0 mm Hg, par rapport à 11,8 mm Hg chez les patients ayant reçu 160 mg de Valsartan en plus.

6.7. Quel est le risque associé à l'utilisation d'AmlodipineValsartan ?

Les effets indésirables les plus couramment observés sous AmlodipineValsartan (chez un à 10 patients sur 100) sont les céphalées (maux de tête), la rhinopharyngite (inflammation du nez et de la gorge), la grippe, l'hypokaliémie (faible taux de potassium dans le sang), divers types d'œdèmes (gonflements), la fatigue (épuisement), les bouffées vasomotrices (rougeurs), l'asthénie (faiblesse) et les bouffées de chaleur. Pour une description complète des effets indésirables observés sous AmlodipineValsartan, voir la notice. AmlodipineValsartan ne doit pas être utilisé chez les patients qui présentent une hypersensibilité (allergie) à l'Amlodipine ou à d'autres médicaments de la catégorie des «dérivés de la dihydropyridine», au Valsartan ou à l'un des autres composants. Il ne doit pas être utilisé chez les femmes ayant dépassé le troisième mois de grossesse. Son utilisation n'est pas recommandée au cours des trois premiers mois de la grossesse. AmlodipineValsartan ne doit pas non plus être utilisé chez les patients souffrant de troubles hépatiques ou biliaires graves, chez les patients présentant certains problèmes cardiaques ni chez les patients souffrant d'hypotension sévère (faible pression sanguine). AmlodipineValsartan ne doit pas non plus être utilisé en association avec des médicaments contenant de l'aliskiren (également utilisés pour traiter l'hypertension essentielle) chez les patients atteints de diabète de type 2 ou chez les patients souffrant d'une insuffisance rénale modérée ou grave. Pour une liste complète des restrictions, voir la notice.

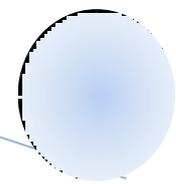


6.8. Pourquoi AmlodipineValsartana-t-il été approuvé ?

Le CHMP a estimé que les bénéfices d'AmlodipineValsartan sont supérieurs à ses risques et a recommandé l'octroi d'une autorisation de mise sur le marché pour ce médicament.(Notice Exforge)

CHAPITRE II :

MATERIEL ET METHODES



1. Paramètres de recherche microbiologiques exigés pour Amlodipine Valsartan LDM®

1.1. Dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT)

Intitulée Anglais: Enumeration of total aerobic germs

Essai préconisé par la Pharmacopée européenne pour déterminer si la qualité microbiologique d'une substance ou d'une préparation est satisfaisante.

➤ **Méthodes proposées :**

Filtration sur membrane ou dénombrement sur plaque et éventuellement, sous certaines conditions, méthode du nombre le plus probable (NPP). Culture sur milieu gélosé aux peptones de caséine. (**Acadpharm, 2016**).

Des spécifications sont précisées pour les préparations pharmaceutiques et les substances pour usage pharmaceutique non stérile ainsi que pour les médicaments à base de plantes pour usage oral.

➤ **Souches utilisées pour la validation du DGAT**

Pour la validation dans le dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) on utilise :
(**Ph. Eur. 9^{ème}, 2017**)

- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).
- *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).
- *Candida albicans* (ATCC 10231).
- *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

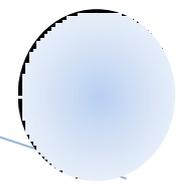
1.2. Dénombrement des moisissures/levures totales (DMLT)

Intitulée Anglais: Enumeration of molds / total yeasts

Essai préconisé par la Pharmacopée européenne pour déterminer si la qualité microbiologique d'une substance ou d'une préparation est satisfaisante.

➤ **Méthodes proposées**

Filtration sur membrane ou dénombrement sur plaque et éventuellement, sous certaines conditions, méthode du nombre le plus probable (NPP). Culture sur milieu Sabouraud dextrosé-gélosé.



Des spécifications sont précisées pour les préparations pharmaceutiques et les substances pour usage pharmaceutique non stériles ainsi que pour les médicaments à base de plantes pour usage oral.(Acadpharm,2016)

➤ **Souches utilisées pour la validation du DMLT**

Pour la validation dans le dénombrement des moisissures/levures totale(DMLT) sont :

(Ph. Eur.9^{ème}, 2017)

- *Candida albicans*(ATCC 10231).
- *Aspergillus brasiliensis*(ATCC16404).

1.3. Recherches spécifiques

- Recherche d'*Escherichia coli* par la souche *Escherichia coli* ATCC 8739
- Recherche de *Salmonella* par la souche *Salmonella entericasubspentericaséovarAbony* NCTC6017
- Recherche de *Pseudomonas aeruginosa* par la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027
- Recherche de *Staphylococcus aureus* par la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

2. Equipement Du Laboratoire

2.1. Matériel

Le matériel utilisé pour l'analyse microbiologique est composé de :Pipettes stériles (1 ml, 10 ml, 5 ml), micropipettes, embouts, poires, spatules, eau purifiée, eau stérile, eau de Javel, boîtes de pétri (90 mm, 55 mm), marqueurs, gaze, ciseaux, alcool, gants, gants stérile, charlotte, sur-chaussures et bavettes.

2.2. Appareillage

Les appareils utilisés dans l'analyse microbiologique c'est :

- **Hotte à flux laminaire**

Une hotte à flux laminaire est un équipement de laboratoire destiné à la protection optimale du produit contre les éventuelles contaminations issues de l'opérateur, de l'environnement ou du plan de travail. Elle est idéale pour les manipulations de substances non dangereuses où la stérilité du produit est requise. La figure 1, montre une image de la hotte à flux laminaire.

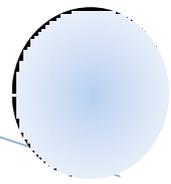


Figure 2 : Hotte à flux laminaire

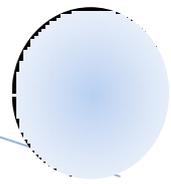
- **Incubateurs**

Sont utilisés pour les laboratoires médicaux de biologie et de microbiologie, que pour le contrôle qualité dans les industries. Les incubateurs (voir figure 2) permettent de maintenir de façon précise une température allant généralement jusqu'à 70 – 80 °C. Ils peuvent se décliner en différentes versions : Incubateur à convection naturelle ou forcée, étuves réfrigérés et incubateurs à CO₂.

La convection naturelle est adaptée pour les incubations de longue durée, les incubations sur supports sensibles au dessèchement et aussi pour des applications sur des poudres. Dans les autres cas les incubateurs ventilés permettent d'obtenir une meilleure homogénéité thermique dans la chambre. Pour obtenir une température précise inférieure ou proche de la température ambiante il est nécessaire d'opter pour un incubateur réfrigéré. Ils sont utilisés très utilisés en culture cellulaire et bactériologie.



Figure 3: incubateur.



- **Compteur de colonies :**

Le compteur de colonies (présenté en figure 4) convient pour des comptages fiables et efficaces. De colonies de bactéries sur boîtes de Pétri, de plaques phages développées sur agar, de colonies de bactéries développées sur disques nutritifs. Utilisable avec une pointe de stylo, la pression exercée sur la boîte de Pétri déclenche le comptage et effectue l'incrémement de 0 à 9999. Mode de correction facile à l'aide de touche fléchée. Pour le comptage de nombres élevés, la lecture est facilitée par un disque Wolffhuegel (en option). (Le Laborantin, 2017)



Figure 4: compteur de colonie.

- **Agitateur Vortex**

L'agitateur type Vortex (voir figure 4) est idéal pour l'agitation de tubes ou de petits flacons. Il est recommandé pour la dissociation des amas cellulaires avant comptage sur lames de numération. (Le Laborantin, 2017)

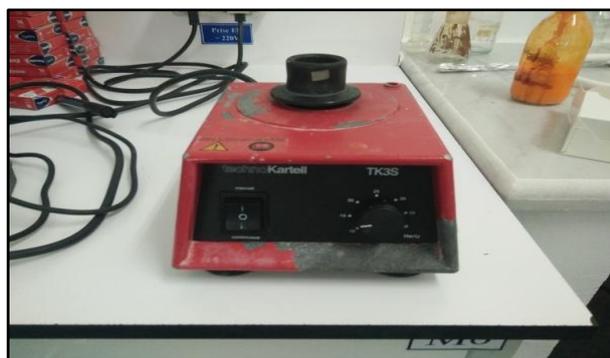
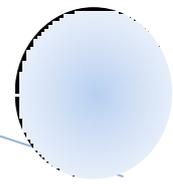


Figure 5: agitateur vortex.



- **Bain-marie**

Les bains-marie sont des équipements de laboratoire permettant de chauffer un récipient dans un bain d'eau ou d'huile (en fonction de la température souhaitée). Pour bien choisir son bain-marie, il est nécessaire d'évaluer le volume nécessaire au chauffage de vos échantillons. Ils nécessitent des accessoires généralement proposés au détail et à commander séparément. Il est conseillé par exemple d'utiliser une plaque couvre résistance qui vient se placer au fond de la cuve du bain marie pour permettre de poser des récipients type erlenmeyer ou bécher. Penser à lester les récipients pour éviter les renversements. Pour chauffer des tubes à essai au bain-marie, utiliser un portoir spécifique au diamètre des tubes utilisés. Il est recommandé d'utiliser un couvercle pour permettre d'éviter l'évaporation et atteindre des températures plus élevées. (Le Laborantin, 2017)



Figure 6: bain-marie.

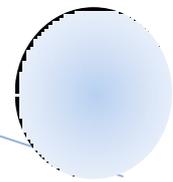
2.3. Echantillonnage

- **Produit fini**

Les prélèvements ont été réalisés par les techniciens de l'entreprise. Il s'agit du trois lots suivant :

Tableau 1: les lots utilisée et leurs DDF et DDP.

Lot	DDF	DDP
7438	11/2017	10/2019
6360	11/2016	10/2018
6361	11/2016	02/2018



Contenant 5 boîte de 30 comprimé de Amlodipine + Valsartan LDM[®] 10mg+160mg.



Figure 7: la boîte de Amlodipine + Valsartan LDM[®].



Figure 8: Amlodipine + Valsartan LDM[®] blister.

3. Milieux De Culture

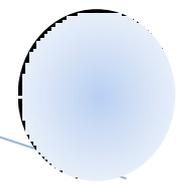
Un milieu de culture est une préparation au sein de laquelle des micro-organismes peuvent se multiplier. Il doit donc satisfaire les exigences nutritives du micro-organisme étudiées ce qui implique :

- ✓ Couvrir les besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance, apporter la source de carbone et d'énergie.
- ✓ Présenter un pH voisin du pH optimal.
- ✓ Présenter une force ionique optimale (le milieu peut être isotonique mais ce n'est pas obligatoire).

Les solutions et milieux suivants se sont avérés satisfaisants pour la réalisation des essais de contamination microbienne prescrits dans la pharmacopée, d'autres milieux peuvent être utilisés dès lors que leur applicabilité peut être démontrée.

3.1. Solution tampon peptonée de chlorure de sodium ph 7,0 : (TSE+ 0,5% Tween 80)

La formule-type répond notamment à la composition décrite dans la Pharmacopée européenne. (Voir ANNEXE 1).



3.2. Milieu liquide aux peptones decaséine et de soja : (TSB)

Domaine D'utilisation

Le bouillon Trypto-caséine soja (TSB) constitue un milieu nutritif universel convenant pour un large éventail d'emplois. Etant donné son excellente valeur nutritive, il favorise la culture d'une grande variété de microorganismes. Il est utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour satisfaire aux tests de stérilité et à la recherche des germes spécifiés et non spécifiés, suivant la Pharmacopée. Il répond également aux formules décrites dans les normes de contrôles relatives aux produits cosmétiques, ainsi qu'en santé animale.

Principes

L'association entre la Tryptone et la peptone papainique de soja réalise une synergie entre l'apport protidique de la caséine et l'apport glucidique du soja, permettant ainsi d'obtenir une croissance optimale pour un nombre élevé de germes.

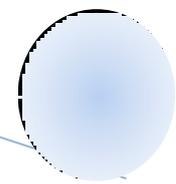
- ✓ Le glucose constitue la source énergétique.
- ✓ Le chlorure de sodium maintient l'équilibre osmotique.
- ✓ Le phosphate dipotassique agit comme substance tampon pour le maintien du pH. (biokar-diagnostics, 2009).

La formule-type répond notamment à la composition décrite dans la Pharmacopée européenne. (Voir ANNEXE 2).

3.3. Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja (TSA)

Domaine D'utilisation

La gélose Trypto-caséine soja (TSA) est un milieu universel convenant pour un large éventail d'emplois. Du fait de son excellente nutritivité, elle peut être utilisée, d'une part pour la culture et isolement des bactéries aérobies et anaérobies, d'autre part pour favoriser la croissance de germes particulièrement exigeants. Coulée en boîtes à fond quadrillé ou sur languettes, elle convient pour les tests rapides d'examen des surfaces. Elle constitue également le milieu de référence utilisé pour l'évaluation des critères de productivité et de sélectivité, pour le contrôle de qualité de certains milieux de culture concernant la chaîne alimentaire et le domaine de l'eau, suivant la norme.



Principes

L'association entre la Tryptone et la peptone papaïnique de soja réalise une synergie entre l'apport protidique de la caséine et l'apport glucidique du soja, permettant ainsi d'obtenir une croissance optimale pour un nombre élevé de germes exigeants et non exigeants. Le chlorure de sodium maintient l'équilibre osmotique. (biokar-diagnostics 2009) La formule-type répond notamment à la composition décrite dans la Pharmacopée européenne. (Voir ANNEXE 3).

3.4. Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé (SDA)

Domaine D'utilisation

La gélose de Sabouraud Dextrose (SDA) est un milieu classique permettant la culture, le dénombrement et l'identification des levures et des moisissures pour le contrôle de stérilité des produits pharmaceutiques et cosmétiques. Elle permet aussi la recherche spécifique de *Candida albicans* dans les produits pharmaceutiques.

Historique

Le milieu a été recommandé par Sabouraud pour la culture des champignons pathogènes associés aux infections cutanées.

Principes

La gélose de Sabouraud Dextrose est un milieu peptoné et glucosé permettant la croissance des levures et des moisissures.

Le pH acide permet d'inhiber la majorité de la flore annexe. (biokar-diagnostics , 2009)

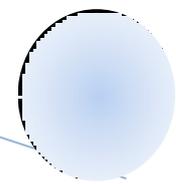
La formule-type répond notamment à la composition décrite dans la Pharmacopée européenne. (Voir ANNEXE 4).

3.5. Milieu liquide de MacConkey (MCB)

Domaine D'utilisation

Le milieu répond à la formule décrite dans la Pharmacopée européenne pour la recherche spécifique d'*Escherichia coli* dans les produits non stériles. Le bouillon de MacConkey peut être aussi utilisé comme milieu présomptif de détection des bactéries coliformes dans l'eau, le lait et les produits de la mer (huîtres).

Historique



Le bouillon de MacConkey constitue une modification de la formule du milieu décrit originellement par MacConkey en 1901. Celui-ci contenait du taurocholate de sodium comme agent inhibiteur et du tournesol comme indicateur. En 1905, MacConkey suggéra l'emploi du rouge neutre au lieu d'indicateur au tournesol. Ultérieurement, Child et Allen démontrèrent l'effet inhibiteur du rouge neutre et lui ont substitué l'emploi de pourpre de bromocrésol, moins inhibiteur.

Principes

La fermentation du lactose par les coliformes est mise en évidence par l'acidification du milieu qui provoque le virage au jaune de l'indicateur pH (pourpre de bromocrésol). La présence de bile purifiée inhibe la croissance des microorganismes à Gram positif. (**biokar-diagnostics, 2009**). La formule-type répond notamment à la composition décrite dans la Pharmacopée européenne. (**Voir ANNEXE 5**).

3.6. Milieu gélosé de MacConkey (MCA)

Domaine D'utilisation

Le milieu répond à la formule décrite dans la Pharmacopée européenne pour la recherche spécifique d'*Escherichia coli* dans les produits non stériles. (**biokar-diagnostics 2009**) La formule-type répond notamment à la composition décrite dans la Pharmacopée européenne. (**Voir ANNEXE 6**).

3.7. Milieu liquide d'enrichissement pour les salmonelles Rappaport-Vassiliadis (RVB)

Domaine D'utilisation

Le bouillon Rappaport-Vassiliadis Soja (RVB) est utilisé pour l'enrichissement sélectif de *Salmonella* dans le lait, les produits laitiers, les autres produits de la chaîne alimentaire, l'eau et les échantillons d'environnement.

Historique

La composition du milieu a été développée par Rappaport suite à l'observation faite de la plus grande résistance des *Salmonella* aux milieux hypertoniques que la plupart des autres entérobactéries. Dans ses expérimentations, Rappaport démontra que le chlorure de magnésium s'avérait être le plus efficace de tous les sels testés. Par addition de vert malachite, il augmenta la sélectivité du milieu. Vassiliadis a par ailleurs montré que pour



recupérer un grand nombre de *Salmonella*, il fallait réduire la teneur en vert malachite et porter l'incubation de 37 °C à 43 °C.

Par la suite, Peterz et al. ont déterminé les incidences de la température d'incubation et de la teneur en chlorure de magnésium sur le pouvoir récupérateur du milieu. Van Schothorst et Renaud ont modifié le bouillon de Rappaport-Vassiliadis en remplaçant la peptone de caséine par la peptone de soja et en incorporant au milieu de l'hydrogénophosphate de potassium pour le tamponner, afin de lui conférer une plus grande stabilité dans le temps.

Principes

La forte concentration en chlorure de magnésium ainsi que la présence de vertes malachites ralentissent la croissance des germes autres que les salmonelles. Les cultures de *Salmonella* Typhi et Paratyphi peuvent être ralenties par la verte malachite, qui est aussi inhibiteur pour *Shigella*. (biokar-diagnostics, 2009) La formule-type répond notamment à la composition décrite dans la Pharmacopée européenne. (Voir ANNEXE 7).

3.8. Milieu gélosé xylose-lysine-désoxycholate (XLD)

Domaine D'utilisation

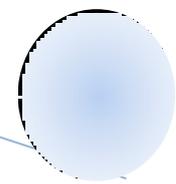
La gélose XLD (Xylose-Lysine-Désoxycholate) est utilisée pour l'isolement des *Salmonella* dans les produits pharmaceutiques. La formule-type répond à la composition définie dans les Pharmacopées européenne. La gélose peut aussi être utilisée comme second milieu au choix dans les méthodes normalisées de recherche de *Salmonella* dans les produits alimentaires et les eaux. Une seconde gélose XLD, correspondant à la formulation normalisée du milieu d'isolement, en microbiologie des aliments et dans les eaux, est proposée sous d'autres références (BK168, BM087).

Historique

Le milieu a été formulé par Taylor pour accroître l'efficacité dans la récupération des entérobactéries pathogènes et plus particulièrement des *Shigella* et des autres germes présentant des exigences particulières qui, dans d'autres formulations contenant des inhibiteurs à toxicité élevée, ne se développent pas.

Principes

Le désoxycholate de sodium assure l'inhibition de la flore contaminante à Gram positif. Le xylose est fermenté par presque tous les germes entéropathogènes, à l'exception des



Shigella qui sont ainsi différenciées des autres bactéries. Après avoir utilisé la xylose, les *salmonelles* décarboxylent la lysine (par l'intermédiaire de leur lysine-décarboxylase) en cadavérine, ce qui provoque une augmentation de pH. En milieu devenu alcalin, les colonies de *salmonelles* se présentent sous le même aspect que les *shigelles*.

Les colonies qui se développent sont de couleur rouge en présence de l'indicateur, le rouge de phénol. L'addition de lactose et de saccharose au milieu permet aux coliformes qui décarboxylent la lysine de produire un excès d'acidité faisant virer l'indicateur au jaune, ce qui favorise leur différenciation. En milieu alcalin et par réduction du citrate ferrique ammoniacal, les germes pathogènes producteurs de sulfure d'hydrogène se manifestent par un noircissement qui est l'apparition de sulfure de fer au centre des colonies. Les germes non pathogènes qui ne décarboxylent pas la lysine produisent une acidification résultant des fermentations sucrées. L'abaissement de pH s'oppose au noircissement des colonies. (biokar-diagnostics, 2016). La formule-type répond notamment à la composition décrite dans la Pharmacopée européenne. (Voir ANNEXE 8).

3.9. Milieu gélosé-cétrimide

Domaine D'utilisation

La gélose au cétrimide est un milieu sélectif destiné à l'isolement et au dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans les produits biologiques d'origine animale, les produits pharmaceutiques et cosmétiques.

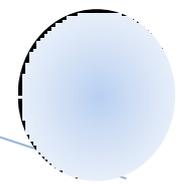
Historique

La formule du milieu est dérivée de celle du milieu de King A qui favorise la production de pyocyanine par *Pseudomonas aeruginosa*. En 1951, Lowbury préconisa l'utilisation de cétrimide dans un milieu sélectif pour l'isolement des *Pseudomonas*. En raison de l'amélioration de la pureté de l'agent inhibiteur, sa concentration fut réduite par Lowbury et Collins en 1955.

Principes

Le cétrimide (bromure de cetyl-triméthyl-ammonium), composé ammonium quaternaire, agit comme inhibiteur d'une grande variété de germes, y compris les espèces de *Pseudomonas* autres que *Pseudomonas aeruginosa*.

La production de pyocyanine (pigment bleu, non fluorescent, soluble dans l'eau et le chloroforme) est stimulée en présence de chlorure de magnésium et de sulfate de potassium.



Le milieu favorise également la production de pigments fluorescents (pyoverdines) par certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

La plupart des *Pseudomonas aeruginosa* sont identifiables à leur odeur d'aminocétophénone. (**biokar-diagnostics,2016**) La formule-type répond notamment à la composition décrite dans la Pharmacopée européenne. (**Voir ANNEXE 9**).

3.10. Milieu gélosé mannitol-sel (Chapman)

Domaine D'utilisation

La gélose de Chapman au mannitol permet l'isolement sélectif, la recherche et le dénombrement des staphylocoques pathogènes dans les eaux filtrables telles que les eaux de piscine, de consommation humaine ou encore d'établissements de soins. Elle est également utilisée pour la recherche de *Staphylococcus aureus* selon la Pharmacopée et dans les produits cosmétiques.

Historique

Les expériences de Koch ont montré que les staphylocoques supportent les milieux hypersalés à 7,5 %. Chapman a confirmé ces premiers résultats en observant que les staphylocoques coagulant le plasma de lapin présentaient des colonies jaunes sur le milieu auquel il a donné son nom, alors que la plupart des autres bactéries étaient inhibées.

Principes

La forte concentration en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plupart des bactéries autres que les staphylocoques.

La fermentation du mannitol, mise en évidence par le virage au jaune de l'indicateur pH (rouge de phénol), permet d'orienter le diagnostic.

La mise en évidence des staphylocoques pathogènes devra être confirmée par la recherche de la coagulase notamment. La formule-type répond notamment à la composition décrite dans la Pharmacopée européenne. (**Voir ANNEXE 10**).

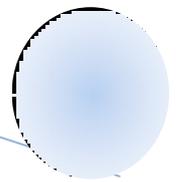


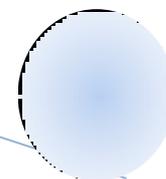
Tableau 2: les bouillants utilisés pour la validation.

TSE+ 0,5% Tween 80	TSB	MCB	RVB

Tableau 3 : les milieux gélosé utilisés pour la validation.

TSA	SDA	MCA	XLD	cétrimide	Chapman

CHAPITRE III :
ETUDE EXPERIMENTALE



1. Introduction

Les essais décrits ci-après permettent le dénombrement des bactéries mésophiles et des moisissures et levures capables de croître en aérobiose, et les essais permettant de contrôler la présence limitée, les microorganismes spécifiés pouvant être décelés dans les conditions décrites.

Ces essais sont en premier lieu destinés à déterminer si une substance ou préparation satisfait à une spécification préétablie en matière de qualité microbiologique. Il convient dans ce cas de se conformer aux indications données ci-après, notamment en ce qui concerne l'interprétation des résultats.

D'autres méthodes microbiologiques, notamment des méthodes automatisées, peuvent être utilisées à condition que leur équivalence avec la méthode de la Pharmacopée ait été démontrée.

L'objectif de ce travail est de décrire la validation de la méthode d'analyse microbiologique de AMLODIPINE+VALSARTAN LDM[®] 10mg + 160 mg afin de démontrer que la méthode convient pour l'usage auquel elle est destinée.

Ce travail s'applique sur l'analyse des lots de produits finis de AMLODIPINE+VALSARTAN LDM[®] 10mg + 160mg, On pérennant comme références pour réaliser cette étude la Pharmacopée européenne 9. 3^{ème} édition, Dossier technique d'AMLODIPINE+VALSARTAN.

2. Site d'étude

Afin de mener à bien notre étude, nous l'avons réalisée au sein du laboratoire pharmaceutique LDM que nous décrivons en dessous.

2.1. Coordonnées

LDM est une entreprise familiale fondée en 1997 par les frères Mohamed, Ahmed et Mouloud ELAMMOUCHI ; son activité consiste en l'importation et la production de produits pharmaceutiques à usage humains.



Figure 9: Carte représentative du site géographique de l'industrie pharmaceutique LDM.



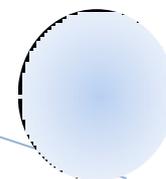
Figure 10 : logo LDM groupe.

- **Raison sociale :** LDM groupe
- **Forme juridique :** société à responsabilité limitée SARL
- **Adresse :** Zone industrielle Oued Hamimime – 25100 El Khroub – Constantine.
- **Tél :** 031 95 53 03 / 04
- **Fax :** 031 95 51 82
- **Site internet :** www.ldmgroupe.com
- **Email :** contact@ldmgroupe.com

2.2. Activités de fabrication de produits pharmaceutiques autorisées et réalisées sur le site

Le Groupe LDM assure la fabrication, le conditionnement et la commercialisation des produits LDM dont la décision d'enregistrement est obtenue :

- La fabrication, le conditionnement et la commercialisation par contrat de sous-licence des produits GSK : Panadol 1G ; PanadolExtra et PanadolR&G auprès de GSK « Irlande » ;



- La fabrication et le conditionnement par contrat de sous-traitance avec plusieurs laboratoires fabricants « *PHARMETHIC ; ABBOTT ; SANOFI ; SERVIER ; TABOUK* » de plusieurs spécialités pharmaceutiques ;
- L'importation et distribution de produits pharmaceutiques et parapharmaceutiques.
- Promotion médicale.
- Formulation et développement.

• **LDM a un permis d'exploitation valide délivré par le ministère de la santé pour :**

✓ **Fabrication des produits pharmaceutiques présentés sous les formes :**

- Sèches non antibiotiques.
- Pâteuses (pommade, crème et gels).

✓ **Conditionnement primaire des formes sèches antibiotiques non bétalactamiques**

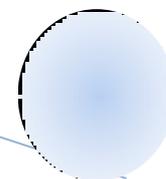
• Le laboratoire contrôle qualité a une décision de validation par le Laboratoire Nationale de Contrôle des produits pharmaceutiques LNCPP renouvelable chaque 2 ans (suite à un audit réalisé par le LNCPP) afin d'effectuer le contrôle physico-chimique et microbiologiques de ses produits.

• Actuellement LDM assure la fabrication, le conditionnement et la commercialisation des produits dont les décisions d'enregistrement sont obtenues ; la fabrication, le conditionnement et la commercialisation des produits GSK :Panadol 1G ; Extra et R&G ; de certains produits « *PHARMETHIC ; ABBOTT ; SANOFI ; SERVIER* ».

• LDM produit des médicaments sous forme de gélules, comprimés, poudre pour suspension buvable « forme sèche » et des gels, crème et pommades « forme semi solide ».

• Différentes classes thérapeutiques fabriquées par LDM :

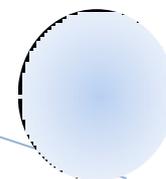
- Antalgiques ;
- Anti inflammatoires ;
- Hypolipidémiantes ;
- Antihypertenseurs ;
- Anti agrégant plaquettaires ;
- Antifongiques ;
- Hypoglycémiantes ;
- Anticonvulsivants ;



- Analgésiques.

Tableau 4: les médicaments produits par LDM

NOM DE SPECIALITE DU PRODUIT
LOSARTAN LDM [®] 50mg
LOSARTAN LDM [®] 100mg
VALSARTAN LDM [®] 160 mg
CARVEDILOL LDM [®] 25mg
GLIMEPIRIDE LDM [®] 2 mg
SIMVASTATINE LDM [®] 20 mg
VALSARTAN LDM [®] 80 mg
SIMVASTATINE LDM 40 mg
PRÉGABALINE LDM [®] 50 mg
CARVEDILOL LDM [®] 6.25mg
PRÉGABALINE LDM [®] 150mg
PRÉGABALINE LDM [®] 300mg
CLOPIDOGREL LDM [®] 75 mg
FLUCONAZOLE LDM [®] 50 mg
FLUCONAZOLE LDM [®] 150 mg
CELECOXIB LDM [®] 100 mg
CELECOXIB LDM [®] 200 mg
VALSARTAN +HCTZ LDM [®] 80 + 12,5
VALSARTAN +HCTZ LDM [®] 160 mg + 12,5 mg
LEVETIRACETAM LDM [®] 250 mg
LEVETIRACETAM LDM [®] 500 mg
FLUVASTATINE LDM [®] 40 mg
FLUVASTATINE LDM [®] 80 mg
AMLODIPINE + VALSARTAN LDM 5mg + 80 mg
AMLODIPINE + VALSARTAN LDM 5mg+160 mg
AMLODIPINE+ VALSARTAN LDM 10mg +160 mg
TERBINAFINE LDM 250 mg
LOSARTAN LDM 100 mg
ARIPIRAZOLE LDM 10 mg



ARIPIRAZOLE LDM 15 mg
AMLODIPINE LDM 5 mg
AMLODIPINE LDM 10 mg
AMISULPRIDE LDM 200 mg
PANADOL [®] EXTRA comprimé pelliculé BT de 16 cp
PANADOL [®] RHUME & GRIPPE comprimé pelliculé BT de 16 cp
PANADOL [®] 1G comprimé pelliculé sécable BT de 8 cp
CYCLADOL [®] 20 mg
DICETEL [®] 100mg
LIPANTHYL [®]
DICETEL [®] 50mg
FLUDEX cp LP 1.5 mg
VASTAREL 35 mg

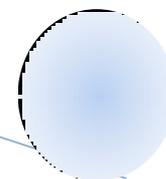
2.3. Différents compartiments de l'industrie LDM

- Unité de production.
- Stock de la matière première et produit fini.
- Le Département de Contrôle Qualité est subdivisé en plusieurs unités fonctionnelles :
 - Laboratoire de contrôle physico-chimique central.
 - Laboratoire de contrôle microbiologique central.
 - Laboratoire de contrôle IPC (au cours de fabrication).
 - Logistique de contrôle de la qualité.

3. Produits et environnement du travail

3.1. Produit à étudier

Le produit utilisé dans cette validation c'est : AMLODIPINE+VALSARTAN LDM[®] 10 mg + 160 mg sur 3 lots différents réalisé sur les tableaux 5 et 6.

**Tableau 5:**Informations sur AMLODIPINE+VALSARTAN LDM®

DCI	Amlodipine + Valsartan
Forme	Comprimé pelliculés
Dosage	10 + 160 mg
Lots	7438, 6360, 6361

Tableau 6 :les lots utilisé pour la validation.

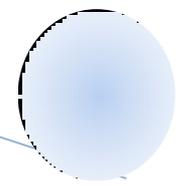
Lot	DDF	DDP
7438	11/2017	10/2019
6360	11/2016	10/2018
6361	11/2016	02/2018

3.2 Matériels et équipements

- Boites de pétri stériles 90 mm et 55mm.
- Pipettes Pasteur stériles.
- Pipettes graduées stériles.
- Tubes à essai stériles.
- Flacons ou erlens avec bouchons stériles.
- Pro pipettes ou poires.
- Lames de microscope
- Pincés stériles
- Hotte à flux laminaire.
- Incubateurs à : 23°C, 33°C et 43°C.
- Compteur de colonies
- Agitateur Vortex
- Bain-marie
- Microscope

3.3 Réactifs et Milieux de culture

- **Milieux**



- Solution tampon peptonée au Chlorure de sodium avec l'ajout de tween 80 à la concentration de 5g/l à la concentration de « TSE+0,5% tween 80 ».
- Milieu liquide aux peptones de caséine et de soja « TSB ».
- Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja « TSA ».
- Milieu liquide de MacConkey « MCB ».
- Milieu gélosé de MacConkey « MCA ».
- Milieu liquide Rappaport-Vassiliadis « RVB ».
- Milieu gélosé Xylose-Lysine-Désoxycholate « XLD ».
- Milieu gélosé Cétrimide.
- Milieu gélosé Mannitol Sel « Chapman ».
- **Colorant de Gram**
 - Cristale violet
 - Lugol's
 - Alcool-Acétone
 - Fuchsine basique
 - Huile d'émissions pour microscope

3.4 Souche de références

✓ Pour dénombrement des germe aérobies mésophiles viables totaux « DGAT »

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

✓ Pour dénombrement des levures et moisissures totales « DMLT »

- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

✓ Pour la recherche d'*Escherichia coli* :

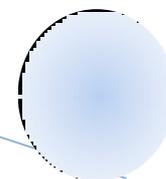
- *Escherichia coli* ATCC 8739

✓ Pour la recherche de *Salmonella* :

- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar *Abony* NCTC 6017

✓ Pour la recherche *Pseudomonas aeruginosa* :

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



3.5. Paramètres de validation

Les paramètres de validation utilisés sont présentés dans le tableau 7.

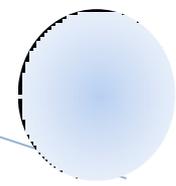
Tableau 7 : Paramètres de validation.

Paramètres	Spécifications
Dénombrement des Germe Aérobie Mésophile Viables Totaux	≤ 1000 UFC/g
Dénombrement des levures et moisissures totales	≤ 100 UFC/g
Recherche <i>Escherichia coli</i>	Absence/g
Recherche <i>Salmonella</i>	Absence/10g
Recherche <i>Staphylococcus aureus</i>	Absence/g
Recherche <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Absence/g

3.6. Plan de travail

Tableau 8 : plan de travail

Tests effectués	Définition	Nombre de répétition
Témoin négatif (T-)	Le contrôle ne contient rien ni le produit à examiner ni le recouvrement microbien	Un seul test est réalisé
Témoin positif (T+)	Contrôle effectué avec ajout d'un volume de la suspension microbienne mais en absence de produit	Un seul contrôle est réalisé pour chaque souche utilisée
Essais négatifs (E-) (contrôle produit)	Contrôle effectué sur le produit seulement	Réaliser sur 3 lots du même produit (7438, 6360, 6361)
Essais positifs (E+)	Contrôle effectué sur le produit avec l'ajout d'un volume de la suspension microbienne	Réaliser sur 3 lots du même produit et séparément pour chaque souche utilisée (7438, 6360, 6361)



4. Calibration des souches

4.1. Protocole de validation

4.1.1. Calibration de la charge microbienne de chaque souche de référence

L'objectif de ce travail est de décrire 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...).

✓ Opération

• Réactifs et milieux de culture

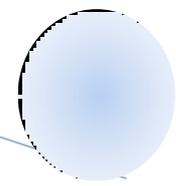
- Solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH=7 (TSE)
- Milieu gélose nutritive (GN)
- Souches de références

• Souche de références

- Candida albicans ATCC 10231
- Staphylococcus aureus ATCC 6538
- Bacillus subtilis ATCC 6633
- Aspergillus brasiliensis ATCC 16404
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027
- Escherichia coli ATCC 8739
- Salmonella Abony NCTC 6017

✓ Mode opératoire

- ✓ Faire sortir les souches de références du Frigo pour les mettre à une température ambiante pendant 30 min.
- ✓ Prendre une jeune colonie récente si possible, 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^{-5}



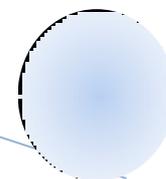
- ✓ De chaque dilution et de chaque souche, transférer 0.1 ml sur une boîte de gélose nutritive et l'ensemencer en stries très serrés sur la surface de la gélose nutritive.
- ✓ Incuber chaque boîte de gélose nutritive à 33°C pendant 18 heures et stocker les tubes au frigo entre 2-8°C pendant 24 heures pour refaire les tests.
- ✓ La durée entre la contamination artificielle et le stockage des tubes dans le frigo ne doit pas dépasser 2 heures.
- ✓ Faire la lecture des boîtes après une incubation de 18 heures, puis retirer du frigo les tubes correspondants à la lecture de X et la lecture de (X-1).
- ✓ Mettre les tubes correspondants à la lecture de X et la lecture de (X-1) à une température ambiante pendant 30 min.
- ✓ Repiquer 0.1 ml de chaque tube sur une boîte GN par la même méthode précédente puis remettre les tubes au frigo et incuber chaque boîte de gélose nutritive à 33°C pendant 18 heures.
- ✓ Mettre les tubes correspondants à une température ambiante pendant 30 min.
- ✓ Repiquer 0.1 ml de chaque tube sur une boîte GN par la même méthode précédente.
- ✓ Incuber les boîtes de GN à 33°C pendant 18 heures.

Faire la lecture après 18 heures d'incubation.

- ✓ Pour chaque souche faire trois répétitions.
- ✓ Calculer le recouvrement de chaque souche après 24h de stockage (la lecture faite après 48h et la lecture faite après 72h) on comparant à la lecture initiale (faite après 24 heures) pour la dilution X.

Le recouvrement=lecture finale/lecture initial.

- ✓ La limite d'acceptation est de 0.5 à 2.00.
- ✓ Les dosages seront utilisés selon le besoin voici quelque exemples :
 - 0.1ml de la dilution X en surface pour les tests de fertilité des milieux de culture solides (l'équivalent de 100 UFC).
 - 0.1ml de la dilution X dans 100ml de milieux de cultures bouillon (l'équivalent de 100UFC).
 - 0.1ml de la dilution X-1 (l'équivalent de 1000 UFC dans 10ml) pour les validations de la DGAT et DMLT dans les validations des méthodes d'analyse.



5. Mode opératoire

La méthode de préparation des échantillons dépend des caractéristiques physiques de notre produit, qui est hydrosoluble dans l'eau. 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 et c'est le cas de notre produit, qui a une résistance au *Staphylococcus aureus* à cause de la présence d'une fonction halogènes (molécule de Chlore), et afin de le neutraliser on a ajouté 0.5% de Polysorbate (Tween 80) au diluant.

5.1. PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Pour la préparation de l'échantillon on a quatre préparations :

- **Du témoin négatif (T-)**

Préparer une quantité de TSE+0,5% tween 80 stérile nécessaire pour la réalisation de tous les tests.

- **Des témoins positifs (T+)**

- Préparer des quantités de TSE+0,5% tween 80 stériles nécessaires pour la réalisation de tous les tests, pour chaque souche.

- Ajouter le volume de la suspension microbienne (de chaque souche séparément) suffisant pour obtenir un inoculum d'au maximum 100 UFC.

- Le volume de suspension utilisé ne doit pas dépasser 1 pour cent du volume du produit dilué.

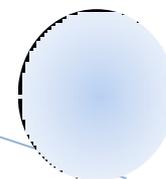
- **Essais négatifs (E-)**

- Flamber brièvement les blisters avec la chaleur montante de la flamme du bec Bunsen.

- Déblistérer 29 comprimés, ce qui équivaut à 10g de AMLODIPINEVALSARTAN LDM® 10mg+160mg, la masse moyenne d'un comprimé de ce produit étant de 347.00mg.

- Dissoudre les 10g de comprimés dans 90 ml de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium avec l'ajout de tween 80 à la concentration de 5g/l pH=7.0 stérile ou un autre diluant approprié, pour avoir un rapport de dilution de 1/10.

- Mélangeant soigneusement au vortex.



- Compléter les dilutions décimales 1/100 et 1/1000, en transférant 1 ml dans 9 ml dans le même diluant.

- **Essais positifs (E+)**

- Flamber brièvement les blisters avec la chaleur montante de la flamme du bec Bunsen.
- Déblastérer 29 comprimés, ce qui équivaut à 10g de AMLODIPINE+VALSARTAN LDM[®] 10mg+160mg, la masse moyenne d'un comprimé de ce produit étant de 347.00mg.
- Dissoudre les 10g de comprimés dans 90 ml de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium avec l'ajout de tween 80 à la concentration de 5g/l pH=7.0 stérile ou un autre diluant approprié, pour avoir un rapport de dilution de 1/10.
- Mélanger soigneusement au vortex.
- Compléter les dilutions décimales 1/100 et 1/1000, en transférant 1 ml dans 9 ml dans le même diluant
- Transférer dans 10ml chaque dilution, 0.1ml de chaque suspension microbienne (de chaque souche séparément) suffisant pour obtenir un inoculum d'au maximum 100 UFC.
- Bien agiter les échantillons à l'aide du Vortex.

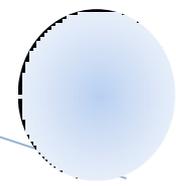
5.2. Dénombrement Des Germes Aérobie Mésophiles Viabes Totaux « DGAT »

Dans le dénombrement des germes aérobies mésophiles viabes totaux on a utilisé la méthode suivante :La méthode choisie est l'ensemencement en profondeur. Pour cette méthode on a suivi les étapes décrites en dessous :

- Préparer 2 boites de 90mm Pétri pour chaque contrôle et les biens identifiés.
- Introduire dans chaque boite de pétri 1ml de chaque échantillon préparé.
- Pour les échantillons contaminés (**Témoin positif et Essais positifs**) inoculer ceux qui contient les suspensions microbiennes suivant : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*.
- Ajouter 15-20 ml du milieu gélosé liquéfié et maintenu en surfusion à 45°C, du milieu TSA.
- Mélanger soigneusement les boites en effectuant des mouvements en forme de « C » et « 8 ».
- Inverser les boites et les incub. à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 3 jours.

5.3. Dénombrement Des Germes Aérobie Levures et Moisissures Totales « DMLT » : La méthode choisie est l'ensemencement en profondeur

Pour cette méthode on a fait :



- Préparer 2 boîtes de 90mm Pétri pour chaque contrôle et les bien identifier.
- Introduire dans chaque boîte de pétri 1ml de chaque échantillon préparé.
- Pour les échantillons contaminés (**Témoin positif et Essais positifs**) inoculer ceux qui contiennent les suspensions microbiennes suivantes : *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*.
- Ajouter 15-20 ml du milieu gélosé liquéfié et maintenu en surfusion à 45°C, du milieu SDA.
- Mélanger soigneusement les boîtes en effectuant des mouvements en forme de « C » et « 8 ».
- Inverser les boîtes et les incuber à 20-25°C (médiane 23°C) pendant 5 jours.

5.4. Recherche spécifique

5.4.1. Recherche *Escherichia coli*

✓ Préparation des échantillons et pré-incubation

- Préparer un échantillon comme il est décrit dans la préparation de l'échantillon.
- Ensemencer 100 ml du milieu liquide TSB avec 10 ml de la dilution.
- Pour les échantillons contaminés ensemencer ceux qui contiennent la suspension microbienne d'*Escherichia coli* seulement.
- Homogénéiser et incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-24 heures.

✓ Sélection et subculture

- Agiter le récipient, puis transférer 1ml du contenu dans 100ml de milieu MCA.
- Incuber les flacons à 42-44°C (médiane 43°C) pendant 24-48 heures.
- Repiquer sur milieu MCA, l'incubation se fait à 30-35°C (médiane 33°C) de 18-72 heures, les boîtes inversées en plus du témoin négatif.

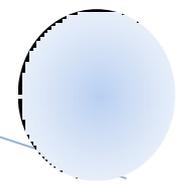
5.4.2. Recherche de *Salmonella*

✓ Préparation de l'échantillon pour *Salmonella*

- Préparer l'échantillon pour *Salmonella* comme celui de la solution mère décrit dans la partie 1.6.1. « préparation de l'échantillon » mais en substituant la solution tampon peptonée au chlorure de sodium par le milieu TSB.
- Inoculer les échantillons de 100ml à contaminés (Essais positifs et le témoin positif) avec 1ml de la souche *Salmonella* seulement.
- Incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-24 heures.

✓ Sélection et subculture

- Transférer 0.1ml du milieu liquide TSB dans 10ml de milieu liquide d'enrichissement pour les *Salmonelles* Rappaport-Vassiliadis.



- Incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-24 heures.
- Repiquer sur du milieu gélosé Xylose-Lysine-désoxycholate (XLD).
- Retourner les boîtes et incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-48 heures avec le témoin négatif

5.4.3. Recherche *Staphylococcus aureus*

✓ Préparation des échantillons et pré-incubation

- Préparer un échantillon comme il est décrit dans la préparation de l'échantillon.
- Inoculer 100 ml du milieu liquide TSB avec 10 ml.
- Pour les échantillons contaminés inoculer ceux qui contiennent la suspension microbienne de *Staphylococcus aureus* seulement.
- Homogénéiser et incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-24 heures.

✓ Sélection et subculture

- Identifier une boîte Pétri du milieu gélosé mannitol-sel (Chapman), probablement coulé et solidifié
- Repiquer sur milieu Chapman.
- Incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18h à 72h. les boîtes retournées.

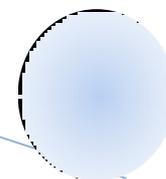
5.4.4. Recherche de *Pseudomonas aeruginosa*

✓ Préparation de l'échantillon et pré-incubation

- Préparer l'échantillon comme il est décrit dans la préparation de l'échantillon.
- Inoculer 10 ml de l'échantillon préparé dans 100ml du milieu liquide TSB.
- Pour les échantillons contaminés inoculer ceux qui contiennent la suspension microbienne de *Pseudomonas aeruginosa* seulement.
- Homogénéiser et incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-24 heures.

✓ Sélection et subculture

- Identifier une boîte Pétri du milieu Cétrimide probablement coulé et solidifié
- Repiquer sur milieu gélosé Cétrimide.
- Retourner les boîtes et incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-72 heures avec le témoin négatif.



5.5. Identification des germes spécifique (coloration de GRAM)

Technique de coloration différentielle distinguant les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif sur la base de leur capacité à retenir le cristal violet, après décoloration par l'éthanol. Cette coloration est fondée sur l'action successive d'un colorant d'aniline (le cristal violet), d'iode puis d'un mélange d'alcool et d'acétone. Dans un premier temps, le colorant pénètre dans la paroi et le cytoplasme.

Dans un second temps, l'iode réagit avec le colorant et le rend insoluble. La perméabilité plus grande des bactéries à Gram négatif à l'alcool permet la décoloration.

Les bactéries à Gram positif restent colorées en mauve. Une contre-coloration (par exemple en rose) permet de visualiser à nouveau les corps cellulaires des bactéries à Gram négatif.

L'intérêt de cette coloration est de donner une information rapide et médicalement importante, car le pouvoir pathogène et la sensibilité aux antibiotiques sont radicalement différents.

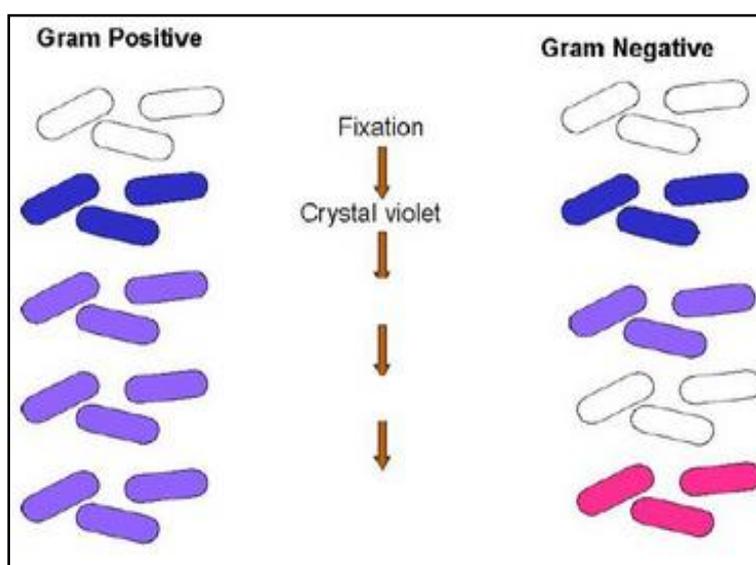


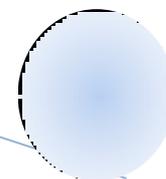
Figure 11: les étapes de la coloration de GRAM.

5.5.1. Technique de la coloration de Gram

➤ Préparation et fixation des frottis

- Etaler en couche mince une goutte de bouillon sur une lame avec une anse de platine stérilisée au bec bunsen.
- Fixer le frottis par séchage de lame en la maintenant dans l'air chaud du bec bunsen.
- La lame doit être lavée à l'eau de javel et rincée par un mélange eau-alcool

➤ La coloration



Les étapes de cette opération sont décrites en dessous :

1. Recouvrir le frottis de violet de gentiane, laissé agir 2 mn au maximum. Rincer à l'eau déminéralisée pour éliminer l'excès de colorant (coloration primaire).
2. Verser sur la lame quelque goutte de lugol et laisser agir une minute au maximum. Rincez à l'eau déminéralisée pour éliminer l'excédent de lugol (fixation au lugol).
3. Incliner verticalement la lame et verser goutte à goutte l'alcool-acétone sur le frottis, jusque l'alcool s'écoule non teintée (décoloration à l'alcool).
4. Rincer abandonnement avec un jet de pissette d'eau déminéralisée.
5. Verser sur le bord de la lame quelques gouttes de fuchsine.
6. laisser agir 1 mn au maximum. ne pas versé la fuchsine directement sur le frottis pour éviter une coloration trop intense.
7. Rincer à l'eau déminéralisée. Laisser sécher au bec bunsen (coloration secondaire).
8. Examiner le frottis avec une goutte d'huile à immersion et dans des champs caractéristique en respectant les proportions relatives et surtout les couleurs à l'objectif 100 (examen après coloration).

6. Résultats Et Interprétations

6.1. Dénombrement des germes aérobies mésophiles viables totaux DGAT

- Après la période d'incubation, procéder au comptage des colonies pour chacune des boites.
- Effectuer le dénombrement des colonies sur les 2 boites de gélose de chaque contrôle effectué.
- Calculer le nombre d'UFC selon la formule suivante :
 $N1 =$ Nombre de colonies dénombrées sur la boite 1/ dilution.
 $N2 =$ Nombre de colonies dénombrées sur la boite 2/ dilution.
- Le nombre d'UFC total est la moyenne calculée sur les 2 boites :
 $\text{Nombre d'UFC/g} = (N1 + N2) / 2.$
- Choisir les boites dénombrables, de la plus grande dilution.
- Calculer l'ajustement D (Essai positif – Essai négatif), et le recouvrement F (moyenne du dénombrement des Essais positifs / moyenne du dénombrement en absence de produit témoins positifs. qui ne doit pas dépasser 2 fois le facteur $0.50 \leq F \leq 2.00$).

1^{ier} Essai : lot 7438Tableau 9: résultats de DGAT 1^{ier} Essai(lot 7438).

Souche	Témoi n (-)	Témoin (+)	Essais (-)			Essais (+)		
			<i>Dilutio</i> <i>n 10⁻¹</i>	<i>Dilutio</i> <i>n 10⁻²</i>	<i>Dilutio</i> <i>n 10⁻³</i>	<i>Dilutio</i> <i>n 10⁻¹</i>	<i>Dilutio</i> <i>n 10⁻²</i>	<i>Dilutio</i> <i>n 10⁻³</i>
<i>P. aeruginosa</i>	00 +00 00 UFC/g	152+15 8 155 UFC/g	00 +00 00 UFC/g	00 +00 00 UFC/g	00 +00 00 UFC/g	98+80 89 UFC/g	93+101 97 UFC/g	91+98 94.5 UFC/g
<i>S. aureus</i>		98+104 101 UFC/g				41+17 29 UFC/g	66+72 69 UFC/g	101+80 90.5 UFC/g
<i>B. subtilis</i>		53+52 52.5 UFC/g				10+06 8 UFC/g	63+65 64 UFC/g	54+41 45.5 UFC/g
<i>C. albicans</i>		178+14 1 159.5 UFC/g				84+92 88 UFC/g	210+13 7 173.5 UFC/g	226+17 0 198 UFC/g
<i>A. brasiliensis</i>		49+62 55.5 UFC/g				39+59 49 UFC/g	62+44 53 UFC/g	77+60 68.5 UFC/g

2^{ème} Essai : lot6360Tableau 10: Résultat de DGAT 2^{ème} Essai (lot 6360).

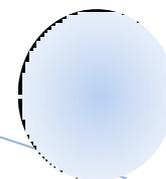
Souche	Témoin (-)	Témoin (+)	Essais (-)			Essais (+)		
			Dilutio $n 10^{-1}$	Dilutio $n 10^{-2}$	Dilutio $n 10^{-3}$	Dilutio $n 10^{-1}$	Dilutio $n 10^{-2}$	Dilutio $n 10^{-3}$
<i>P. aeruginosa</i>	00 +00 00 UFC/g	161+170 165.5 UFC/g	00 +00 00 UFC/g	00 +00 00 UFC/g	00 +00 00 UFC/g	93+101 97 UFC/g	161+166 163.5 UFC/g	188+111 149.5 UFC/g
<i>S. aureus</i>		44+75 59.5 UFC/g				01+12 6.5 UFC/g	41+72 56.5 UFC/g	39+53 46 UFC/g
<i>B. subtilis</i>		57+39 48 UFC/g				02+05 3.5 UFC/g	45+45 45 UFC/g	54+33 43.5 UFC/g
<i>C. albicans</i>		169+163 166 UFC/g				99+105 102 UFC/g	196+193 194.5 UFC/g	238+205 221.5 UFC/g
<i>A. brasiliensis</i>		91+96 93.5 UFC/g				129+162 145.5 UFC/g	108+122 115 UFC/g	196+206 201 UFC/g

3^{ème} Essai : lot 6361Tableau 11: Résultat de DGAT 3^{ème} Essai (lot 6361).

Souche	Témoi n (-)	Témoin (+)	Essais (-)			Essais (+)		
			Dilutio n 10 ⁻¹	Dilutio n 10 ⁻²	Dilutio n 10 ⁻³	Dilution 10 ⁻¹	Dilution 10 ⁻²	Dilution 10 ⁻³
<i>P. aeruginosa</i>	00 +00 00 UFC/g	161+170 165.5 UFC/g	00 +00 00 UFC/g	00 +00 00 UFC/g	00 +00 00 UFC/g	76+97 86.5 UFC/g	104+76 90 UFC/g	139+113 126 UFC/g
<i>S. aureus</i>		44+75 59.5 UFC/g				11+01 6.5 UFC/g	30+71 50.5 UFC/g	39+53 46 UFC/g
<i>B. subtilis</i>		57+39 48 UFC/g				01+00 0.5 UFC/g	53+48 50.5 UFC/g	28+60 44 UFC/g
<i>C. albicans</i>		169+163 166 UFC/g				112+127 119.5 UFC/g	100+143 121.5 UFC/g	116+96 106 UFC/g
<i>A. brasiliensis</i>		91+96 93.5 UFC/g				83+99 91 UFC/g	95+92 93.5 UFC/g	127+118 122.5 UFC/g

Calcul d'ajustement

L'ajustement est nul, D (Essai positif – Essai négatif), parce que tous les essais négatifs sont égaux à 00 UFC/g (**D = Essai positif – Essai négatif**)



Taux de recouvrement

($F=E+ / T+$) : moyenne du dénombrement de l'essai en présence du produit / la moyenne de dénombrement en absence de produit critère d'acceptation : $0.50 \leq F \leq 2.00$

Tableau 12: taux de recouvrement pour la recherche DGAT (lot 7438, 6360, 6361).

Lot		<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
7438	T+	155 UFC/g	101 UFC/g	53 UFC/g	160 UFC/g	56 UFC/g
	E+	97 UFC/g	69 UFC/g	64 UFC/g	174 UFC/g	53 UFC/g
	F	0.62	0.68	1.20	1.08	0.94
	T+	161 UFC/g	60 UFC/g	48 UFC/g	166 UFC/g	94 UFC/g
6360	E+	164 UFC/g	57 UFC/g	45 UFC/g	195 UFC/g	115 UFC/g
	F	1.01	0.95	0.93	1.17	1.22
6361	E+	90 UFC/g	51 UFC/g	51 UFC/g	122 UFC/g	94 UFC/g
	F	0.55	0.85	1.06	0.73	1

Toutes les dilutions testées donnent un résultat satisfaisant, c'est pourquoi la plus faible dilution est retenue soit au 1/1000.

Tous les germes ont un taux de recouvrement compris entre 0.50 et 2.00

Spécification= 10^2 UFC/g.

6.2. Dénombrement des levures et moisissures totales (DMLT)

- Après la période d'incubation, procéder au comptage des colonies pour chacune des boîtes.
- Effectuer le dénombrement des colonies sur les 2 boîtes de gélose de chaque contrôle effectué.

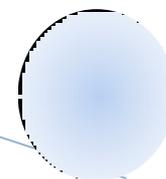
- Calculer le nombre d'UFC selon la formule suivante :

N1= Nombre de colonies dénombrées sur la boîte 1/ dilution.

N2= Nombre de colonies dénombrées sur la boîte 2/ dilution.

- Le nombre d'UFC total est la moyenne calculée sur les 2 boîtes :

Nombre d'UFC/g= $(N1+N2)/2$.



- Calculer l'ajustement D (Essai positif – Essai négatif), et le recouvrement F (moyenne du dénombrement des Essais positifs /moyenne du dénombrement en absence de produit témoins positifs).

1^{er} Essai lot7438

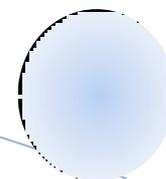
Tableau 13: résultat de DLMT 1^{er} Essai (lot 7438).

Souche	Témoin (-)	Témoin (+)	Essais (-)		Essais (+)	
			Dilution 10 ⁻¹	Dilution 10 ⁻²	Dilution 10 ⁻¹	Dilution 10 ⁻²
<i>C. albicans</i>	00 +00 00 UFC/g	148+154 151 UFC/g	00 +00 00 UFC/g	00 +00 00 UFC/g	82+69 75.7 UFC/g	133+132 132.5 UFC/g
<i>A. brasiliensis</i>		101+55 78 UFC/g			87+100 93.5 UFC/g	122+91 106.5 UFC/g

2^{ème} Essai lot 6360

Tableau 14: résultat de DLMT 2^{ème} Essai (lot 6360).

Souche	Témoin (-)	Témoin (+)	Essais (-)		Essais (+)	
			Dilution 10 ⁻¹	Dilution 10 ⁻²	Dilution 10 ⁻¹	Dilution 10 ⁻²
<i>C. albicans</i>	00 +00 00 UFC/g	134+129 131.5 UFC/g	00 +00 00 UFC/g	00 +00 00 UFC/g	128+93 110.5 UFC/g	121+145 133 UFC/g
<i>A. brasiliensis</i>		53+59 56 UFC/g			100+87 93.5 UFC/g	79+66 72.5 UFC/g



3^{ème} Essai lot 6361

Tableau 15: résultat de DLMT 3^{ème} Essai (lot 6361).

Souche	Témoin (-)	Témoin (+)	Essais (-)		Essais (+)	
			Dilution 10 ⁻¹	Dilution 10 ⁻²	Dilution 10 ⁻¹	Dilution 10 ⁻²
<i>C. albicans</i>	00 +00 00 UFC/g	134+129 131.5 UFC/g	00 +00 00 UFC/g	00 +00 00 UFC/g	115+126 120.5 UFC/g	114+120 117 UFC/g
<i>A. brasiliensis</i>		53+59 56 UFC/g			76+66 71 UFC/g	74+84 79 UFC/g

Tableau 16: Taux de recouvrement pour la recherche DMLT (lot 7438, 6360, 6361).

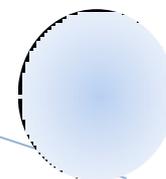
Lot		<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>	
7438	T+	151 UFC/g	78 UFC/g	Satisfaisant
	E+	76 UFC/g	94 UFC/g	
	F	0.50	1.20	
	T+	132 UFC/g	56 UFC/g	
6360	E+	111 UFC/g	94 UFC/g	Satisfaisant
	F	0.84	1.68	
6361	E+	121 UFC/g	71 UFC/g	Satisfaisant
	F	0.91	0.75	

Toutes les dilutions testées donnent un résultat satisfaisant, c'est pourquoi la plus faible dilution est retenue soit au 1/100.

Tous les germes ont un taux de recouvrement compris entre 0.50 et 2.00

Limite de détection= 10UFC/g.

Spécification= 10²UFC/g



6.3. Recherche *Escherichia coli*

La croissance des colonies indique la présence possible d'*Escherichia coli* qui est confirmés par des tests d'identification (coloration de Gram).

Tableau 17: Résultat de la recherche *Escherichia coli* lots 7438, 6360,6361.

Les témoins et les essais	T+	E+	T-	E-	Conclusion
7438	croissance des colonies	Croissance des colonies	absence de croissance	Absence de croissance	Satisfaisant
6360		Croissance des colonies		Absence de croissance	Satisfaisant
6361		Croissance des colonies		Absence de croissance	Satisfaisant

✓ Recouvrement

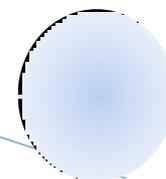
Le taux de recouvrement entre les essais positifs et leurs témoins positifs est homogène.

Identification (coloration de Gram)

cocco-bacille de couleur rose, Gram négatif, confirme la présence d'*Escherichia coli* elle-même.



Figure 12: Photographie microscopique -coloration de GRAM-
Escherichia coli



6.4. Recherche *Salmonella*

La croissance des colonies rouges, bien développées, avec ou sans centre noir, indique la présence possible de *Salmonelles* à confirmer par des essais d'identification.

Tableau 18: Résultat de la recherche *Salmonella* lots 7438, 6360,6361.

Les témoins et les essais	T+	E+	T-	E-	Conclusion
7438	croissance des colonies	Croissance des colonies	absence de croissance	Absence de croissance	Satisfaisant
6360		Croissance des colonies		Absence de croissance	Satisfaisant
6361		Croissance des colonies		Absence de croissance	Satisfaisant

✓ **Recouvrement**

Le taux de recouvrement entre les essais positifs et leurs témoins positifs est homogène.

✓ **Identification (coloration de Gram)**

Bacille de couleur rose, Gram négatif, confirme la présence de *Salmonella* elle-même

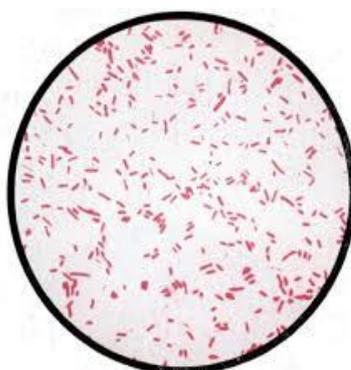
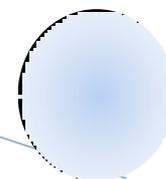


Figure 13: Photographie microscopique -coloration de GRAM-*Salmonella*



6.5. Recherche *Staphylococcus aureus*

La croissance des colonies jaunes/blanches entourées d'une zone jaune, indique la présence possible de *S. aureus*.

Tableau 19: Résultat de la recherche *Staphylococcus aureus* lots 7438, 6360,6361.

Les témoins et les essais	T+	E+	T-	E-	Conclusion
7438	croissance des colonies	Croissance des colonies	absence de croissance	Absence de croissance	Satisfaisant
6360		Croissance des colonies		Absence de croissance	Satisfaisant
6361		Croissance des colonies		Absence de croissance	Satisfaisant

✓ Recouvrement

Le taux de recouvrement entre les essais positifs et leurs témoins positifs est homogène.

✓ Identification (coloration de Gram)

Cocci de couleur, Gram positif, confirme la présence de *Staphylococcus aureus* elle-même.

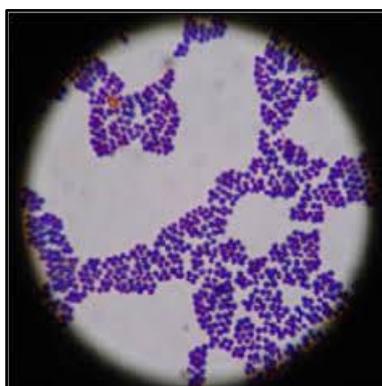
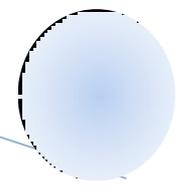


Figure 14: Photographie microscopique -coloration de GRAM- *Staphylococcus aureus*.



6.6. Recherche *Pseudomonas aeruginosa*

La croissance de colonies indique la présence possible de *Pseudomonas aeruginosa* à confirmer par des tests d'identification.

Tableau 20: Résultat de la recherche *Pseudomonas aeruginosa* lots 7438, 6360,6361.

Les témoins et les essais	T+	E+	T-	E-	Conclusion
7438	croissance des colonies	Croissance des colonies	absence de croissance	Absence de croissance	Satisfaisant
6360		Croissance des colonies		Absence de croissance	Satisfaisant
6361		Croissance des colonies		Absence de croissance	Satisfaisant

✓ **Recouvrement**

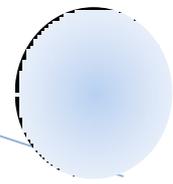
Le taux de recouvrement entre les essais positifs et leurs témoins positifs est homogène.

✓ **Identification (coloration de Gram)**

Des bacilles de couleur rose, Gram négatif, confirme la présence de *Pseudomonas aeruginosa* elle-même.



Figure 15: Photographie microscopique -coloration de GRAM-*Pseudomonas aeruginosa*.



Conclusion

Toutes les procédures et les analyses ont but pour créer un protocole final (**voir Annexe 11**) de ce médicament AMLODIPINE+VALSARTAN LDM[®], qui contient toutes les étapes que nous avons réalisées, afin de valider une méthode conforme et spécifique.

Conclusion générale

Le contrôle de qualité national réalisé en Algérie pour les laboratoires de biologie médicale par LNC et les entrepreneurs comme SANOFI, ABBO... exige la validation d'une méthode d'analyse microbiologique des produits pharmaceutiques à commercialiser sur le marché, pour s'assurer de leur bonne qualité.

Dans ce contexte, nous avons mené une étude et une expérience qui a duré 5 mois, environ. Durant laquelle, nous avons bénéficié d'un stage au sein du laboratoire pharmaceutique LDM, qui nous a chaleureusement accueilli et fourni l'environnement nécessaire afin de réaliser nos expérimentations. Ainsi, ce mémoire est le fruit d'une étude dans laquelle nous sommes intéressés à la validation d'une méthode d'analyse microbiologique. Par ailleurs, nous avons étudié le cas du médicament « Amlodipine + Valsartan 10 + 160 ».

Afin de réaliser notre objectif, nous avons passé par un ensemble des étapes. La première était la récolte des informations et la compréhension du contexte de travail. La deuxième était la familiarisation avec l'environnement et les méthodes de travail et la troisième était la réalisation des différents essais et expériences.

Bien que la méthode a été validée et qu'on pourra l'utiliser en routine. Mais les déviations sont possibles, les erreurs et les accidents aussi. C'est la raison pour laquelle on envisage l'ajout des éléments de validation dans la méthode : on étalonne ou on calibre l'appareil, on ajoute des contrôles ou des témoins positifs et négatifs dans les séries. Ainsi, on s'assure que chaque série est conforme.

Il faut également continuer à valider que le laboratoire reste compétent, et que les résultats ne dérivent pas. Pour cela, un moyen efficace est la participation à des essais interlaboratoires. Le laboratoire reçoit régulièrement des échantillons à analyser. Il renvoie alors les résultats qui sont traités statistiquement. Tous les participants peuvent ensuite analyser leur résultat en comparaison avec tous les autres.

Références

(Raynaud, 2011) Validation du procédé de fabrication dans l'industrie pharmaceutique, appliquée aux formes solides orales.

(Gaignault, 1982 ; Durant et Le Jeune, 2017) Contrôle qualité physico-chimique et microbiologique de la FLUVASTATINE LDM 80 mg.

(Husson H, 2011) Matières premières pharmaceutiques, mondialisation et santé publique, académie nationale de pharmacie.

(Talbert et al, 2001) Contrôle qualité physico-chimique et microbiologique de la FLUVASTATINE LDM 80 mg.

(Chast, 2016) Contrôle qualité physico-chimique et microbiologique de la FLUVASTATINE LDM 80 mg.

(Ansm, 2016) Contrôle qualité physico-chimique et microbiologique de la FLUVASTATINE LDM 80 mg.

(WHO, 2016) Contrôle qualité physico-chimique et microbiologique de la FLUVASTATINE LDM 80 mg.

(Holloway, 2004) Contrôle qualité physico-chimique et microbiologique de la FLUVASTATINE LDM 80 mg.

(Ph. Eur.9^{ème}, 2017) Pharmacopée européenne.

(Ansm, 2013) Contrôle qualité physico-chimique et microbiologique de la FLUVASTATINE LDM 80 mg.

(ICH Q10, 2013) International Conference en Harmonization.

(Ernoul, 2013) Contrôle qualité physico-chimique et microbiologique de la FLUVASTATINE LDM 80 mg.

(Lanoux, 2003) Contrôle qualité physico-chimique et microbiologique de la FLUVASTATINE LDM 80 mg.

(International Conference on Harmonization, 2010) International Conference on Harmonization.

(Raynaud, 2011) Validation du procédé de fabrication dans l'industrie pharmaceutique, appliquée aux formes solides orales.

(Renaud ,2016) Validation des méthodes analytiques : application à une méthode de détermination de la biocharge (bioburden) avant filtration stérilisante issue de la Pharmacopée européenne.

(PMEII/UNOP, 2013) Audit qualité du laboratoire de contrôle qualité & validation des méthodes microbiologiques 10/2013.

(Le Hir, 2001) Evaluation microbiologique « Bioévaluation » et physicochimique dans l'industrie pharmaceutique.

(Notice Exforge) Notice médicament princepseeexforge.

(Bennett, R.J. et A.D. Johnson, 2005)*Mating in Candida albicans and the search for a sexual cycle* », *Annu rev Microbiol.*, n° 59, 2005, p. 233-255.

(Aquaportail. 2017) www.aquaportail.com/definition-212-pseudomonas.html.

(Aquaportail. 2017) www.aquaportail.com/definition-10543-staphylocoque.html.

(Aquaportail. 2017) www.aquaportail.com/definition-9840-bacterie-e-coli.html.

(Aquaportail. 2017) www.aquaportail.com/definition-3329-salmonelle.html.

(Aquaportail. 2017)www.aquaportail.com/definition-212-pseudomonas.html.

(biokar-diagnostics,2009) www.biokar-diagnostics.fr

(Le Laborantin, 2017)www.laborantin.com/agitateur-vortex-a-vitesse-reglable-701441.html.

(Acadpharm, 2016) <http://dictionnaire.acadpharm.org/w/D%C3%A9nombrement>.

Annexe

Annexe 1 : TSE+ 0,5% Tween 80

- 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 80 5,0g/l
- Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé. **(Ph. Eur.9^{ème}, 2017)**

Annexe 2 :TSB

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

Annexe 3 : 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. **(Ph. Eur.9^{ème}, 2017)**

Annexe 4 : SDA

- Dextrose 40.0 g.
- Mélange de peptone peptique do tissu animal et de peptone pancréatique do 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. **(Ph. Eur.9^{ème}, 2017)**

Annexe 5 : MCB

- Hydrolysate 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. **(Ph. Eur.9^{ème}, 2017)**

Annexe 6 : MCA

- Hydrolysat 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 biliaires 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 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ après stérilisation. Portez à ébullition pendant 1 min en agitant constamment, puis stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé. (**Ph. Eur.9^{ème}, 2017**)

Annexe 7 :(RVB)

- Peptone de soja 4.5 g.
- Chlorure de magnésiumhexahydraté 29.0 g.
- Chlorure de sodium 8,0 g.
- Phosphate dipotassique 0,4 g.
- Phosphate monopotassique 0.6 g.
- Vert malachite 0,036 g.
- Eau purifiée 1000 ml.

Dissolvez en chauffant doucement, stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé, à une température ne dépassant pas $115\text{ }^{\circ}\text{C}$, le PH doit être de $5,2 \pm 0,2$ à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ après chauffage et passage à l'autoclave. (**Ph. Eur.9^{ème}, 2017**)

Annexe 8 : XLD

- Xylose 3,5 g.
- L-Lysine 5,0 g.
- Lactose monohydraté 7,5 g.
- Saccharose 7,5 g.
- Chlorure de sodium 5,0 g.
- Extrait de levure 3,0 g.
- Rouge de phénol 80 mg.
- Gélose 13.5 g.
- Désoxycholate sodique 2,5 g.
- Thiosulfate de sodium 6,8 g.
- Citrate ferrique et d'ammonium 0,8 g.
- Eau purifiée 1000 ml.

Ajustez le pH pour qu'il soit de $7,4 \pm 0,2$ à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ après chauffage. Chauffez à ébullition, refroidissez à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ et répartissez en boîtes de Pétri, ne chauffez pas en autoclave. (**Ph. Eur.9^{ème}, 2017**)

Annexe 9 :cétrimide

- Hydrolysat pancréatique de gélatine 20.0g.
- Chlorure de magnésium 1,4g.
- Sulfate dipotassique 10.0g.

- Cétrimide 0,3g.
- Gélose 13.6g.
- Eau purifiée 1000ml.

Chauffez à ébullition pendant 1 min en agitant, Ajustez le pH pour qu'il soit de $7,2 \pm 0,2$ à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé. (**Ph. Eur.9^{ème}, 2017**)

Annexe 10 : Chapman

- Peptone pancréatique de caséine 5.0 g
- Peptone peptique de tissu animal 5,0 g
- Extrait de viande de bœuf 1,0 g
- D-Mannitol 10.0 g
- Chlorure de sodium 75.0 g
- Gélose 15.0 g
- Rouge de phénol 0.025 g
- Eau purifiée 1000 ml

Chauffez à ébullition pendant 1 min en agitant. Ajustez le pH pour qu'il soit de 7,4 \pm 0,2 à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé. (**Ph. Eur.9^{ème}, 2017**)

PROCOLE DE CONTRÔLE

PRODUIT FINI

Spécialité : AMLODIPINE+VALSARTAN LDM® 10mg+160mg.

DCI/ Forme/ Dosage :AmlodipineValsartan / Comprimé pelliculé/ 10mg+160mg.

Laboratoire : LDM.

Référence : Dossier technique et Pharmacopée Européenne 9,3^{ième} édition.

Matériels & Equipements

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Boites de pétri stériles.• Pipettes Pasteur stériles.• Pipettes graduées stériles.• Flacons ou Erlens avec bouchons stériles.• Propipettes ou poires. | <ul style="list-style-type: none">• Bec Bunsen/ Hotte à flux laminaire.• Incubateurs à : 23°C, 33°C, 43°C.• Compteur de colonies.• Agitateur Vortex.• Bain-marie. |
|---|---|

Réactifs et Milieux de culture

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Solution tampon peptonée au Chlorure de sodium avec l'addition de 0,5% de tween 80, pH=7.• Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ou TSA.• Milieu Sabouraud dextrosé gélosé.• Milieu gélosé de MacConkey.• Milieu gélosé Cétrimide. | <ul style="list-style-type: none">• Milieu gélosé Mannitol-sel• Milieu liquide de MacConkey.• Milieu liquide aux peptones de caséine et de soja ou TSB.• Milieu liquide Rappaport-Vassiliadis.• Milieu gélosé Xylose-Lysine-Désoxycholate XLD. |
|---|--|

Contrôle microbiologique des produits non stériles

Le contrôle microbiologique consiste à la vérification de la quantité de germes aérobies totaux appelé : dénombrement et de l'absence de germes spécifiés dans l'échantillon.

Normes :

Dénombrement microbien :

Germes Aérobie Viables Totaux.....Pas plus de 10^3 UFC/g.

Levures et moisissures.....Pas plus de 10^2 UFC/g.

Recherche de microorganismes spécifiés :

Escherichia coli.....Absence/g.

Staphylococcus aureus.....Absence/g.

Pseudomonas aeruginosa.....Absence/g

Salmonella.....Absence/ 10g.

UFC/g : Unité Formant Colonies par gramme de produit.

PROCOLE DE CONTRÔLE

PRODUIT FINI

Préparation de l'échantillon

- Pour chaque lot de AMLODIPINE+VALSARTAN[®] LDM 10mg+160mg, à analyser, prélever les échantillons au hasard et à différents niveaux de production.
- **Préparation de la solution mère :**
 - Flamber brièvement le blister avec la chaleur montante de la flamme du bec Bunsen.
 - Déblister 29 comprimés, ce qui équivaut à 10g de AMLODIPINE+VALSARTAN LDM[®] 10mg+160mg, la masse moyenne d'un comprimé de ce produit étant de 347.00mg.
 - Dissoudre les comprimés de AMLODIPINE+VALSARTAN[®] LDM 10mg+160mg dans 90ml de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium avec 0.5% Tween 80, pH=7.0 stérile ou un autre diluant approprié (dilution 1/10).
 - Mettre au bain-marie à 40°C pour faciliter la dissolution du produit.
 - Mélanger soigneusement au vortex de temps à autre.
 - Compléter la dilution 1 /100 avec le même diluant.

Examen de l'échantillon

Dénombrement microbien

Le dénombrement est réalisé par la technique suivante :

- **Ensemencement en profondeur :** et qui consiste à :
 - Préparer 2 boîtes de pétri par milieu.
 - Introduire dans chaque boîte de pétri 1ml de la dilution 1/100 préparé.
 - Ajouter 15-20ml du milieu gélosé liquéfié et maintenu en surfusion à 45°C, adapté à chaque milieu de culture. (Le milieu TSA pour les bactéries et le milieu Sabouraud dextrosé gélosé pour les levures et moisissures).
 - Mélanger soigneusement les boîtes en effectuant des mouvements en forme de « C » et « 8 ».

PROTOCOLE DE CONTRÔLE

PRODUIT FINI

- Retourner les boîtes et incuber les milieux de culture TSA à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 5 jours et les milieux Sabouraud-dextrose gélosés à 20-25°C (médiane 23°C) pendant 7 jours.
 - Préparer un témoin négatif pour chaque type de dénombrement.
 - **Interprétation des résultats :**
 - Après la période d'incubation, procéder au comptage des colonies pour chacune des boîtes des 2 milieux.
 - Effectuer le dénombrement des colonies sur les 2 boîtes de gélose.
 - Calculer le nombre d'UFC selon la formule suivante :
N1= Nombre de colonies dénombrées sur la boîte 1/ dilution.
N2= Nombre de colonies dénombrées sur la boîte 2/ dilution.
 - Le nombre d'UFC total est la moyenne calculée sur les 2 boîtes :
Nombre d'UFC/g = (N1+N2)/2.
- AMLODIPINE+VALSARTAN LDM® 10mg+160mg est conforme à l'essai si les résultats du test satisferont aux normes suivantes :

Normes	Produit conforme	
	Limite d'acceptation	Limite maximale d'acceptation
Flore Dénombrée		
DGAT	$\leq 10^3$ UFC/g	$\leq 2 \times 10^3$ UFC/g
DMLT	$\leq 10^2$ UFC/g	$\leq 2 \times 10^2$ UFC/g

Recherche des germes spécifiés

- **Recherche *Escherichia coli* :**
 - **Préparation des échantillons et pré-incubation :**
 - ensemencer 100ml du milieu liquide TSB avec 10ml de la dilution 1/10 préparé.
 - homogénéiser et incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-24 heures.

- **Sélection et subculture :**
- Agiter le récipient, puis transférer 1ml du contenu dans 100ml de milieu liquide MacConkey.
- Incuber les flacons à 42-44°C (médiane 43°C) pendant 24-48 heures.
- Repiquer sur milieu gélosé MacConkey, l'incubation se fait à 30-35°C (médiane 33°C) de 18-72 heures, les boites retournées en plus du témoin négatif.

PROCOLE DE CONTRÔLE

PRODUIT FINI

- **Interprétation des résultats :**
- La croissance de colonies indique la présence possible d'*Escherichiacoli* qui est confirmés par des tests d'identification.

- AMLODIPINE+VALSARTAN LDM® 10mg+160mg est conforme à l'essai s'il n'est pas observé de colonies ou si les tests de confirmation de l'identification sont négatifs.

- **Recherche de *Staphylococcus aureus* :**
 - **Préparation de l'échantillon et pré-incubation :**
 - Ensemencer 100ml du milieu liquide TSB avec 10ml de la dilution 1/10 préparé.
 - Homogénéiser et incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-24 heures.
 - **Sélection et subculture :**
 - Repiquer sur milieu gélosé Mannitol-sel et incuber ensuite les boites leurs fonds tournés vers le haut avec le témoin négatif à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-72 heures.
 - **Interprétation des résultats :**
 - La croissance de colonies jaunes/blanches entourées d'une zone jaune, indique la présence possible de *Staphylococcus aureus*, ceci peut être confirmé par des tests d'identification.

- AMLODIPINE+VALSARTAN LDM® 10mg+160mg est conforme à l'essai si l'on n'observe pas des colonies du type décrit ou si les tests de confirmation d'identification sont négatifs.

- **Recherche de *Pseudomonas aeruginosa* :**
 - **Préparation de l'échantillon et pré-incubation :**
 - Ensemencer 100ml du milieu liquide TSB avec 10ml de la dilution 1/10 préparé.
 - Homogénéiser et incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-24 heures.
 - **Sélection et subculture :**
 - Repiquer sur milieu gélosé Cétrimide.
 - Retourner les boites et incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-72 heures avec le témoin négatif.
 - **Interprétation des résultats :**
 - La croissance de colonies indique la présence possible de *Pseudomonas aeruginosa* à confirmer par des tests d'identification.

- AMLODIPINE+VALSARTAN LDM[®] 10mg+160mg est conforme à l'essai si l'on n'observe pas de colonies ou si les essais de confirmation de l'identification sont négatifs.

PROTOCOLE DE CONTRÔLE

PRODUIT FINI

- **Interprétation des résultats :**
 - La croissance de colonies indique la présence possible de *Pseudomonas aeruginosa* à confirmer par des tests d'identification.
- AMLODIPINE+VALSARTAN LDM[®] 10mg+160mg est conforme à l'essai si l'on n'observe pas de colonies ou si les essais de confirmation de l'identification sont négatifs.
- **Recherche de *Salmonella* :**
 - **Préparation de l'échantillon pour *Salmonelle* :**
 - Préparer l'échantillon comme il est décrit dans la partie « préparation de l'échantillon » mais en utilisant le milieu TSB comme diluant.
 - Incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-24 heures.
 - **Sélection et subculture :**
 - Transférer 0.1ml du milieu liquide TSB dans 10ml de milieu liquide d'enrichissement pour les Salmonelles Rappaport-Vassiliadis.
 - Incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-24 heures.
 - Repiquer sur du milieu gélosé Xylose-Lysine-désoxycholate (XLD).
 - Retourner les boîtes et incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-48 heures avec le témoin négatif.
 - **Interprétation des résultats :**
 - La croissance des colonies rouges, bien développées, avec ou sans centre noir, indique la présence possible de Salmonelles à confirmer par des essais d'identification.
 - AMLODIPINE+VALSARTAN LDM[®] 10mg+160mg est conforme à l'essai si l'on n'observe pas des colonies du type décrit ou si les tests de confirmation d'identification sont négatifs.

Nom et Prénom : AOUAG Seif Eddine
YOUCEF Zakaria

Date de soutenance : 28/06/2018

**Thème : Validation d'une méthode d'analyse microbiologique d'un médicament
« AMLODIPINE + VALSARTAN LDM® 10+ 160 mg » dans le laboratoire de produit
pharmaceutique**

Résumé : La nécessité fondamentale pour l'accès aux médicaments fiables et sans danger constitue un droit inaliénable de tout citoyen. En partant de ce principe que l'OMS a fait de la qualité, la sécurité et l'efficacité des médicaments le fondement de sa stratégie thérapeutique. Or, le médicament est un produit d'une rare complexité, qui pour être bénéfique au patient, exige dans sa conception, sa fabrication, sa manipulation et son usage des précautions extrêmement rigoureuses.

Ainsi, la politique des agences réglementaires régissant ce domaine a pu évoluer d'une manière exponentielle avec l'accroissement du besoin, les autorités mondiales de santé ont et depuis 1962 exigé certaines normes et mesures afin de sécuriser au maximum ce secteur. C'est dans ce contexte que la validation d'une méthode d'analyse microbiologique de produit **pharmaceutique** a été introduite, afin de maîtriser, démontrer et documenter qu'un médicament peut être fabriqué de façon fiable et répétitive par des procédés déterminés.

Dans cette étude, nous avons établi un état de l'art dans lequel nous avons abordé, les définitions des différents types des Paramètres à maîtriser dans l'industrie pharmaceutique, et l'importance impact de la microbiologie dans la qualité d'un médicament. Et afin d'obtenir un produit d'une bonne qualité microbiologique on a **montré les** paramètres de la validation (analyse qualitative, analyse quantitative, performances d'une méthode microbiologique selon les conditions d'exécution de l'essai...). Afin de démontrer que la méthode de validation adoptée convient pour l'usage auquel elle est destinée, on a pris comme exemple à étudier le médicament : AMLODIPINE + VALSARTAN LDM® 10+ 160 mg. La validation de la méthode d'analyse microbiologique a certainement pu d'abord sécuriser la qualité pharmaceutique d'AMLODIPINE + VALSARTAN LDM® et aussi elle nous a permis d'établir un protocole de contrôle microbiologique du médicament AMLODIPINE + VALSARTAN LDM.

Mot clés : Qualité, microbiologique, validation, AMLODIPINE + VALSARTAN LDM® 10+ 160 mg.

Laboratoire : Contrôle qualité pharmaceutique " LDM "

Président de jury : Nouredine KACEM CHAOUECHE Pr. Univ. Constantine 1.

Rapporteur : Mme GHERBOUDJ Amira Dr. Univ. Constantine 1.

Examinatrice : Mme MADI Aicha Dr. Univ. Constantine 1.

Responsable de stage : MIMOUNI Kenza Chef tache microbiologie.