

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



**Université Frère 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 :** BENTOBAL Mohamed Bachir  
BOUFRAH Rania

## *Thème*

**Validation d'une méthode Microbiologique pour le médicament « ATORVASTATINE 80 mg » dans les laboratoires pharmaceutiques LDM.**

### **Jury d'évaluation:**

**Président de jury:** Pr.HAMIDECHI Abdelhafid

**Rapporteur :** Dr BATAICHE Insaf

**Examinatrice :** Dr GHORRI Sana

**Responsable de stage :** Mr LEBSIR Nouredine

**Prof. Univ. Constantine 1.**

**MCB.Univ.Constantine 1.**

**MCB.Univ .Constantine 1**

**Responsable contrôle qualité LDM**

**ANNEE UNIVERSITAIRE: 2018-2019**

# Remerciement

*On remercie **Dieu** le tout puissant d'être avec nous et de nous avoir donné le courage et la volonté pour achever notre travail.*

*La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui on voudrait témoigner toute notre gratitude.*

*On voudrait d'abord adresser toute notre reconnaissance au chef du département **Mr Kacem Chaouèche** pour tout ce qu'il a fait pour nous, il nous a toujours encouragé, stimuler notre volonté et planter en nous l'amour pour cette spécialité. On désire aussi remercier tout les professeurs de l'université de Mentouri qui nous ont enseigné et qui nous ont fourni les outils nécessaires à la réussite de nos études universitaires plus particulièrement notre président de jury monsieur le **Pr. HAMIDECHI Abdelhafid** , ainsi que **Mme.GHORRI Sana** notre deuxième maman. On remercie le responsable de l'industrie pharmaceutique LDM qui nous a ouvert ses portes et mis à notre disposition le tout ce dont nous avons besoin pour réaliser notre stage dans de bonnes conditions. Ainsi que toute l'équipe du laboratoire d'analyses et de contrôles de qualité.*

*Un grand merci à notre encadreur au sein de LDM **Mr Lebsir Noureddine** qui a partagé avec nous ses connaissances et expériences et qui a consacré son temps pour nous former, nous orienter et répondre à toutes nos questions.*

*Un remerciement à notre encadreur **Mme Bazaïche** pour avoir relu et corrigé notre mémoire. Ses conseils de rédaction ont été précieux.*

*Un merci à nos amis, collègues et proches qui nous ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de notre démarche.*

# Dédicace

*Je dédie ce modeste travail:*

*A mes très chers **parents** pour leur patience, leur soutien  
et leur sacrifice qui m'ont poussé à aller jusqu'au bout  
de cette tâche, que dieu me les garde.*

*A ma sœur **Nesrine**.*

*A mes **cousins** et **cousines** pour leurs soutien inconditionnel.*

*A toute ma famille.*

*Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes  
côtés, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études supérieures et  
durant l'accomplissement de ce travail*

*A Tous mes enseignants sans exception.*

**BACHIR.**

# Dédicace

*Je dédie ce simple travail que j'ai façonné avec amour et bonne humeur  
À ma très chère maman qui m'a toujours soutenu et suivie tout au long de mon  
parcours d'études incluant mes études universitaires.*

*À mon père*

*À mon frère Abdeldjalil*

*À ma chère défunte grand-mère qui nous a quittés il a un mois, j'avais toute son  
affection et ses conseils pour réussir*

*À mon binôme Bachir*

*Ainsi qu'à toute ma famille, mes amis et les personnes qui ont toujours été là  
pour moi.*

**Rania**

# Table des matières

Remerciements et Dédicaces.....	
Table des matières .....	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux.....	
Liste des abréviations.....	
<b>1-Introduction</b> .....	

## 2-Revue Bibliographique

2.1- Généralités sur les médicaments.....	2
2.1.1- Définition .....	2
2.1.2- Composition .....	2
2.1.2.1- Principe actif .....	2
2.1.2.2- Excipients .....	2
2.1.2.3- Forme galénique/formes pharmaceutiques.....	3
2.1.3- Développement d'un médicament.....	3
2.1.3.1- Médicaments princeps.....	4
2.1.3.2-Médicaments génériques .....	4
2.1.4- La dénomination commun internationale (DCI).....	4
2.2-Médicament ATORVASTATINE 80mg.....	5
2.2.1- Définition.....	5
2.2.2- Composition et formule chimique.....	5
2.2.2.1-Principe actif.....	5
2.2.2.2-Excipients.....	5
2.2.2.3-Pelliculage.....	5
2.2.3-Indications d'utilisation.....	5
2.2.4-Association avec d'autres médicaments.....	6
2.3-Contrôle de la qualité pharmaceutique.....	6
2.3.1-Définition de la qualité.....	6
2.3.2-Facteurs de maîtrise.....	6
2.3.3-Les modalités de maîtrise des risque "5M" .....	7
2.3.4-L'assurance qualité.....	8
2.3.5-Les bonnes pratiques de fabrication.....	8

2.3.6-Contrôle microbiologique .....	8
2.4-Validation.....	9
2.4.1-Définition.....	9
2.4.2-La validation dans l'industrie pharmaceutique.....	9
2.4.3-Cycle de vie d'une méthode d'analyse.....	10
2.4.3.1-Processus de validation.....	11
2.4.4-Types de validation dans l'industrie pharmaceutique.....	12
2.4.4.1-Validation prospective.....	12
2.4.4.2-Validation rétrospective.....	12
2.4.4.3-Validation concomitante (ou simultanée).....	12
2.4.4.5-Revalidation.....	13
2.4.5-Critères de performance d'une analyse microbiologique.....	13
2.4.5.1-Limite de détection de la méthode .....	13
2.4.5.2-Limites de qualification de la méthode.....	13
2.4.5.3-Fidélité .....	13
2.5-Validation des méthodes d'analyses microbiologiques.....	14
2.5.1-Paramètres de validation d'une méthode.....	14
2.5.1.1-Analyse qualitative (décision oui/non).....	14
2.5.1.2-Analyse quantitative (en lien avec une limite fixée) .....	14
2.5.2-Indicateurs à contrôler lors d'une validation.....	15
2.5.3-Contamination microbienne d'un produit pharmaceutique.....	16
2.5.4-Représentation des souches utilisées dans la validation de ATORVASTATINE (80mg)...	16
2.6-Présentation du laboratoire de diagnostic magrébins (LDM).....	17
2.6.1-Définition.....	17
2.6.2-Activités du groupe LDM.....	17
2.6.2.1-Classes thérapeutiques et médicaments .....	18
2.6.3-Les unités du laboratoire de contrôle de qualité d'LDM .....	19

### **3-Matériel et méthodes**

3.1- L'équipement utilisé au laboratoire de microbiologie.....	20
3.1.1- Généralités sur le matériel.....	20
3.1.2- Salle de préparation.....	20
3.1.3- Salle de manipulation.....	20
3.1.4- Salle d'incubation.....	21
3.2-Milieus de cultures utilisés.....	21

3.2.1- Solution tamponné peptonée chlorure de sodium pH7 additionnée au Tween 80 (TSE 1% Tween 80).....	22
3.2.1.1- TSE (Bouillon tryptone-sel).....	22
3.2.1.2- Tween 80 (Le polysorbate80).....	22
3.2.1.3- Préparation du milieu TSE 1% Tween 80.....	22
3.2.2- Milieu liquide aux peptones de caséine et de soja(TSB).....	23
3.2.3-La gélose trypto-caséine-soja (TSA).....	23
3.2.4- Milieu Sabouraud dextrose-gélosé (SDA).....	24
3.2.5- Milieu liquide de MacConkey (MCB).....	24
3.2.6-Milieu gélosé de MacConkey (MCA).....	24
3.2.7- Milieu liquide d'enrichissement des salmonelles Rappaport-vassiliadis (RVB).....	25
3.2.8- Milieu gélosé xylose-lysine-desoxychlorates (XLD).....	25
3.2.9- Milieu gélosé-cétrimide.....	25
3.2.10- Milieu gélosé mannitol-sel (Chapman).....	25
3.3-Produit à étudier.....	26
3.4-Paramètres de validation microbiologique à étudier.....	26
3.4.1-Dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT).....	27
3.4.1.1-Principe.....	27
3.4.1.2-Les souches microbiennes utilisées pour la validation du DGAT.....	27
3.4.2-Dénombrement des moisissures/levures totales (DMLT).....	28
3.4.2.1-Principe.....	28
3.4.2.2-Les souches utilisées pour la validation DMLT.....	28
3.4.3-Recherche spécifiques.....	28
3.4.3.1-Principe.....	28
3.4.3.2-Les souches microbiennes utilisées.....	28
3.5-Normes d'acceptation de la validation.....	29
3.5.1-Limite d'acceptation dénombrement DGAT,DMLT.....	29
3.5.2-Critères d'acceptation pour la recherche spécifique.....	29
3.6-Calibrage des souches .....	29
3.6.1-Calibrage de la charge microbienne de chaque souche de référence.....	29
3.6.2-Protocole de calibrage.....	30
3.7-Protocole de la validation microbiologique.....	30
3.7.1-Protocole paramètres du dénombrement DGAT, DMLT.....	31
3.7.1.1-Manipulation effectuée.....	31
3.7.1.2-Protocole du dénombrement du DGAT.....	32

3.7.1.3-Protocole du dénombrement du DMLT.....	33
3.7.2-Protocole de la recherche spécifique.....	33
3.7.2.1- Recherche <i>Escherichia coli</i> .....	33
3.7.2.2-Recherche <i>Staphylococcus aureus</i> .....	34
3.7.2.3-Recherche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	34
3.7.2.4-Recherche de <i>Salmonella</i> .....	35

## **4- Résultats et discussions**

4.1-Résultats et discussion.....	36
4.1.1-Lancement des expériences de la validation microscopique.....	36
4.1.1.1- 1 <sup>ère</sup> expérience .....	36
4.1.1.2- 2 <sup>ème</sup> expérience.....	40
4.1.1.3- 3 <sup>ème</sup> expérience.....	41
4.1.1.4- 4 <sup>ème</sup> expérience.....	42
4.1.2-Validation microbiologique des différents lots.....	43
4.1.2.1- 1 <sup>er</sup> lot 8224.....	43
4.1.2.2- 2 <sup>ème</sup> lot 8225.....	49
4.1.2.3- 3 <sup>ème</sup> lot 8226.....	51
4.1.3- Protocole de validation microbiologique récapitulatif.....	53

## **5-Conclusion .....**

## **6-Références Bibliographiques.....**

## **7-Résumés.....**

## **8-Annexes.....**



# Listes des figures

<b>Figure 1</b> : Compositions, origines et formes des médicaments.....	2
<b>Figure 2</b> : Principales étapes du développement d'un médicament .....	3
<b>Figure 3</b> : médicament générique par rapport au princeps .....	4
<b>Figure 4</b> : Structure chimique du principe actif de l'ATORVASTATINE 80mg.....	5
<b>Figure 5</b> : Principaux facteurs de variations d'une analyse.....	7
<b>Figure 6</b> : Structure de l'Assurance Qualité des médicaments.....	8
<b>Figure 7</b> : Cycle de vie d'une méthode analytique.....	11
<b>Figure 8</b> : Processus de validation dans un laboratoire de contrôle qualité.....	11
<b>Figure 9</b> : Le logo du Laboratoire de Diagnostic Magrébins (LDM).....	17
<b>Figure 10</b> : représentation de la boîte et blister (ATORVASTATINE).....	26
<b>Figure 11</b> : préparation solution mère avec la première dilution décimale.....	31
<b>Figure 12</b> : Repiquage pour la recherche spécifique de <i>Escherichi coli</i> .....	45
<b>Figure 13</b> : Résultat repiquage recherche spécifique pour la souche <i>Staphylococcus aureus</i> .....	46
<b>Figure 14</b> : Résultat repiquage recherche spécifique pour la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	47
<b>Figure 15</b> : Repiquage de la recherche spécifique de la <i>Salmonella</i> .....	48

# Liste des Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Les principales formes galéniques .....	3
<b>Tableau 2</b> : Agents usuels de neutralisation des substances interférentes .....	15
<b>Tableau 3</b> : Liste de médicaments produits par LDM.....	18
<b>Tableau 4</b> : Information sur le produit ATORVASTATINE (80mg).....	26
<b>Tableau 5</b> : Paramètres de validation (Pharmacopée européenne 9.2) et dossier technique... ..	27
<b>Tableau 6</b> : Les dilutions idéales trouvées lors du calibrage des souches .....	30
<b>Tableau 7</b> : Dilutions et concentrations de neutralisant testées... ..	31
<b>Tableau 8</b> : Taux de recouvrement Dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) (1ère expérience) .....	37
<b>Tableau 9</b> : Taux de recouvrement Dénombrement des moisissures et levures totaux (DMLT) (1ère expérience) .....	38
<b>Tableau 10</b> : Le résultat des différentes souches de recherche spécifique... ..	39
<b>Tableau 11</b> : Taux de recouvrement du dénombrement des germes aérobies totaux DGAT (2ème expérience) .....	40
<b>Tableau 12</b> : Taux de recouvrement du DGAT (3ème expérience) .....	41
<b>Tableau 13</b> : Taux de recouvrement du DGAT (4ème expérience) .....	42
<b>Tableau 14</b> : Taux de recouvrement du DGAT du lot 8224.....	43
<b>Tableau 15</b> : Taux de recouvrement du DMLT du lot 8224.....	44
<b>Tableau 16</b> : Recherche d' <i>E.coli</i> pour le lot 8224.....	45
<b>Tableau 17</b> : Recherche de <i>S.aureus</i> pour le lot 8224.....	46
<b>Tableau 18</b> : Recherche de <i>S.aureus</i> du lot 8224 après modifications des paramètres (TSB+1% Tween 80).....	47
<b>Tableau 19</b> : Recherche <i>P.aeruginosa</i> du lot 8224... ..	48
<b>Tableau 20</b> : Recherche de <i>Salmonella</i> du lot 8224... ..	49
<b>Tableau 21</b> : DGAT du 2ème lot 8225.....	50
<b>Tableau 22</b> : DMLT du lot 8225 .....	50
<b>Tableau 23</b> : Recherche des souches spécifiques lot 8225.....	51
<b>Tableau 24</b> : Résultats DGAT lot 8226.....	52
<b>Tableau 25</b> : Résultats DMLT lot 8226.....	52
<b>Tableau 26</b> : Recherche des souches spécifiques lot 8226... ..	53

# Liste des abréviations

**AMM** : Autorisation de mise sur le marché

**BPF** : Bonnes pratiques de fabrication

**BPL** : Bonnes pratiques de laboratoire

**C°** : Degré Celsius.

**CQ**: Contrôle Qualité.

**D** : L'ajustement.

**DCI** : Dénomination Commune Internationale.

**DDF** : Date De Fabrication.

**DDP** : Date De Péréemption.

**DGAT** : Dénombrement Des Germes Aérobieux Totaux.

**DMLT** : Dénombrement Des Moisissures/Levures Totales.

**EMA**: European medicine Agency

**FDA**: Food and Drug Administration

**F** : Taux de recouvrement.

**GN** : Gélose Nutritive.

**HACCP** : Système analyses des dangers et point critiques.

**ICH**: International Conference on Harmonization.

**ISO**: Organisation internationale de normalisation.

**LDM**: Laboratoire de Diagnostic Magrébins.

**LNCPP** : Laboratoire national de contrôle qualité pharmaceutique.

**LDL** : Cholestérol « lipoprotéine » mauvais cholestérol.

**MCA** : Milieu gélosé de MacConkey.

**MCB** :MacConkey Bouillon.

**NPP** : Le Nombre le Plus Probable.

**OMS**: Organisation Mondiale de la Santé.

**PDCA**: plan, Do, Check, Act ‘’Roue de deming’’

**Ph. Euro. 9ème**: Pharmacopée Européenne.

**pH**:Potentiel Hydrogène.

**PSM** : Poste de sécurité microbiologique.

**RVB** : Le Bouillon Rappaport-Vassiliadis Soja.

**SDA** : La Gélose De Sabouraud Dextrose.

**SM** : Solution Mère.

**TSA** : La Gélose Trypto-Caséine Soja.

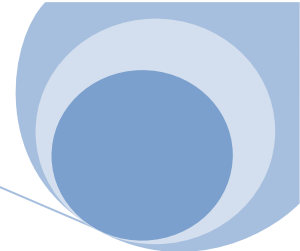
**TSB** : Trypto-Caséine Soja Bouillon.

**TSE** : Solution Tampon Peptonée De Chlorure De Sodium.

**UFC** : Unité Formant Colonie.

**XLD** : Xylose-Lysine-Désoxycholate La Gélose.

# *Introduction*



## 1-Introduction

L'industrie pharmaceutique appartient au secteur économique regroupant les activités de recherche et développement, de fabrication et de commercialisation des médicaments à usage humain.

Le médicament qui est un produit de consommation particulier utilisé dans le but de prévenir ou traiter une maladie ou encore d'établir un diagnostic médical. Sa fabrication est donc encadrée et l'industrie pharmaceutique est tenue de se conformer à une réglementation stricte afin de garantir la **qualité**, la **sécurité** et l'**efficacité** des médicaments qui seront délivrés aux patients **(Renaud, 2016)**.

Cependant la plus part des patients n'imaginent pas tout ce qui est mis en place, en amont, par les industriels pour atteindre cette qualité devenue un point-clé de la concurrence du fait de l'importance de l'offre par rapport à la demande. Ainsi, son obtention passe le plus souvent par l'utilisation des outils de la qualité tant au niveau de la conception que de la réalisation des produits.

Le respect de ces exigences passe par l'assurance de la qualité pharmaceutique, Alors que la validation des procédés et méthodes est mise en œuvre lors de l'élaboration du médicament afin de s'assurer qu'ils sont parfaitement maîtrisés et conduiront de façon reproductible au résultat attendu **(Renaud, 2016)**.

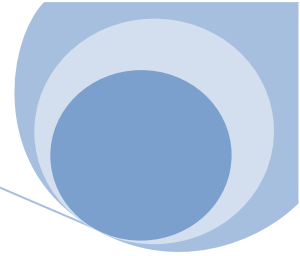
La validation est donc la preuve qu'un procédé fonctionne : elle doit être effectuée en utilisant des principes scientifiques, afin d'établir l'applicabilité du procédé et de confirmer l'acceptabilité du médicament **(OMS, 2014)**.

Après avoir détaillé des généralités sur les médicaments, le contexte réglementaire lié à la validation, les types de validation de procédé de fabrication seront définis, ainsi que la maîtrise d'un procédé validé. La validation d'un procédé de fabrication étant réalisée dans un contexte de validation global, les autres types de validation seront également décrits.

La seconde partie du présent travail vise à suivre la validation des méthodes microbiologiques, de façon plus détaillée l'ATORVASTATINE (80mg) afin de démontrer que la méthode convient pour l'usage auquel elle est destinée.

En s'appuyant sur la Pharmacopée européenne 9. 2<sup>ème</sup> édition et le Dossier technique.

**Revue  
Bibliographique**



## 2-Revue Bibliographique

### 2.1-Généralités sur les médicaments

#### 2.1.1-Définition

Un médicament est « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal, ou pouvant être administrée en vue d'établir un diagnostic ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique » (Gauroud, 2012).

#### 2.1.2-Composition

Un médicament est composé de matière première (principe actif), excipient et éléments de mise en forme pharmaceutique destinés à être utilisés ou administrés chez l'homme ou l'animal (Husson, 2011).

**2.1.2.1-Principe actif** C'est la substance responsable de l'effet pharmacologique du médicament.

**2.1.2.2-Excipient(s)** C'est une substance ou un mélange de substances inactives par elles-mêmes sur la maladie et qui permettent de faciliter l'emploi du médicament et de fabriquer la forme galénique souhaitée. Ils n'ont pas de propriétés pharmacologiques et ne doivent pas interagir avec le principe actif (Hallouët, 2016).

La composition et la synthèse d'un médicament est illustré dans la (figure 1).

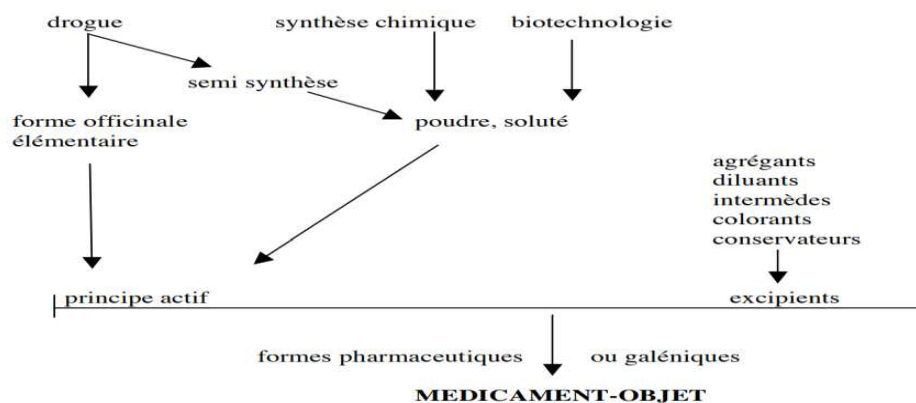
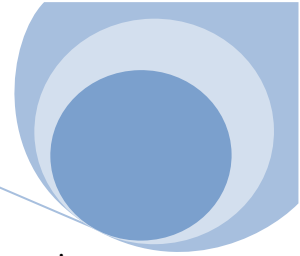


Figure 1 : compositions, origines et formes des médicaments (Dangoumau, 2006).






## 2.1.2.3-Les formes galéniques / formes pharmaceutiques

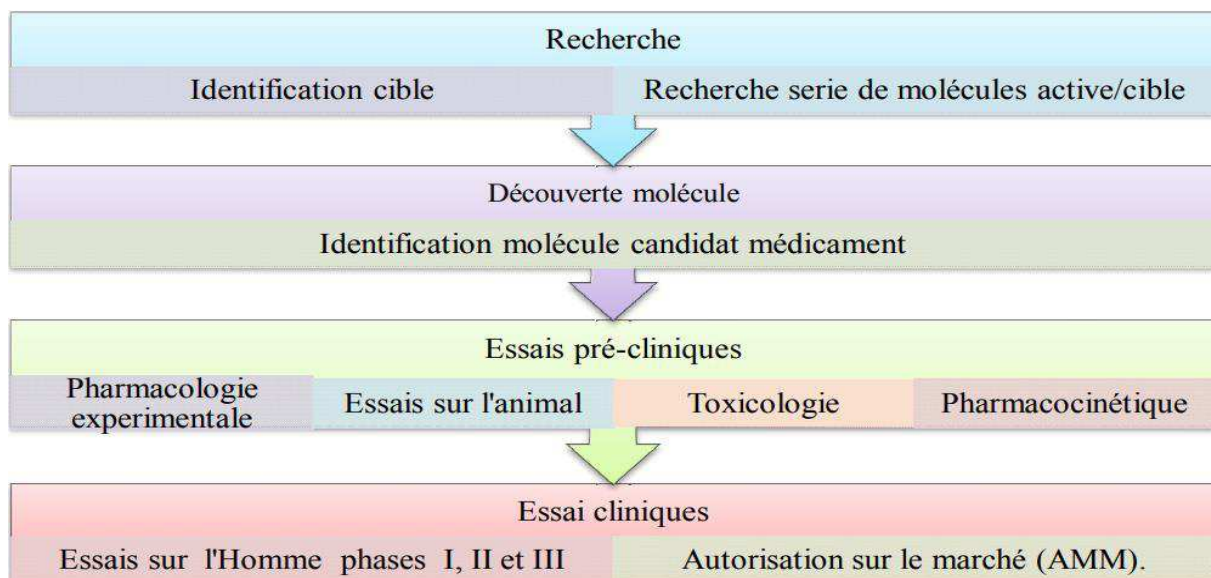
Les formes galéniques sont généralement regroupées sous quatre principales présentations physiques selon le tableau1.

**Tableau 1** : Les principales formes galéniques (Calop et al., 2012).

Les solides <i>Ex. Comprimés</i> <i>Gélules</i>	Les liquides <i>ex. Sirop</i>	Les semi-solides <i>ex. Pommade</i>	Les volatils <i>ex. Aérosols</i>
			

## 2.1.3-Développement d'un médicament

L'introduction d'un nouveau produit chimique sur le marché, qui est de plus en plus complexe et exige très souvent de très nombreuses étapes de fabrication, fait l'objet de réglementations, une vingtaine de produits voient le jour chaque année (Fernando, 2010). La (figure 2) détaille le concept.



**Figure 2** : Principales étapes du développement d'un médicament (Fernando, 2010)

### 2.1.3.1-Médicaments princeps

C'est un médicament qui incorpore pour la première fois un principe actif qui a été isolé ou synthétisé par un laboratoire pharmaceutique.

Il s'agit en quelques sortes du médicament « original », il est protégé par un brevet d'une durée variable (de l'ordre de 10 ans) qui assure au laboratoire qui l'a déposé l'exclusivité de son exploitation et de sa commercialisation (il est le seul à pouvoir vendre un médicament avec ce principe actif) (Aïache et al., 2008) .

### 2.1.3.2-Médicaments génériques

Est une notion aujourd'hui très encadrée : c'est une copie d'un médicament original, mais pas nécessairement une copie strictement identique. Il doit avoir la même composition qualitative et quantitative en principes actifs, la même forme pharmaceutique que la spécialité de référence et démontrer la bioéquivalence avec cette dernière, c'est-à-dire la même biodisponibilité dans l'organisme et en conséquence la même efficacité (ANSM 2012).

La (figure3) nous montre la différence entre le médicament princeps et les médicaments génériques au niveau de la forme et de la couleur :

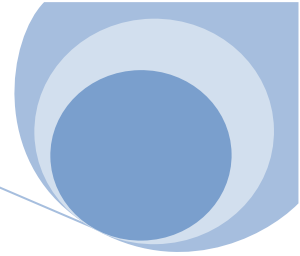


Figure 3 : médicament générique par rapport au princeps.

### 2.1.4- La dénomination commune international (DCI)

Les dénominations communes internationales (DCI) identifient les substances pharmaceutiques ou les principes actifs pharmaceutiques. Chaque DCI est une appellation unique reconnue au niveau de l'organisation mondiale de santé (OMS).

La plupart des produits disponibles sur le marché sont identifiés par un nom de marque(ou noms de spécialités) qui sont utilisés lors de la prescription, de la dispensation, de la vente, de la promotion des médicaments.



## 2.2-Médicament ATORVASTATINE 80mg

### 2.2.1 Définition

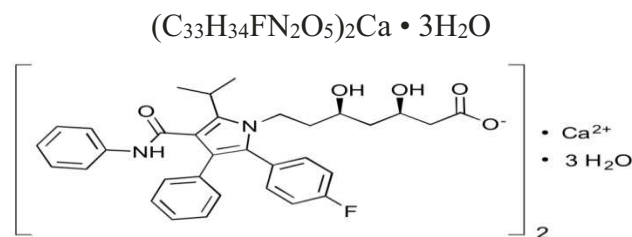
L'ATORVASTATINE est un médicament qui appartient au groupe de médicaments appelés inhibiteurs réductase (les statines) ou régulateurs du métabolisme lipidique (Hypolipémiant) utilisé pour soigner les personnes qui ont un taux de cholestérol élevé, y compris les personnes qui ont certains troubles de cholestérol d'origine génétique.

C'est des comprimés pelliculés blancs à blanc cassé, oblongs, biconvexes.

Les comprimés pelliculés d'ATORVASTATINE EG 80 mg sont emballés sous plaquette en Aluminium de 30 comprimés pelliculés.

### 2.2.2-Composition et formule chimique

2. 2.2.1-Principe actif ATORVASTATINE (DCI) calcium trihydraté 80mg, sa formule chimique est la suivante :  $(C_{33}H_{34}FN_2O_5)_2Ca \cdot 3H_2O$  structurée dans la (Figure 4).



**Figure 4 :** Structure chimique du principe actif de l'Atorvastatine 80mg.

#### 2.2.2.2-Excipients

Lactose monohydrate  $C_{12}H_{24}O_{12}$  ; Cellulose microcristalline ; Croscramellose de sodium ; Carbonate de calcium ; Polysorbate 80 ; Hydroxylpropyl cellulose ; Stéarate de magnésium.  
Excipients à effet notoire : Lactose 272.480 mg (ATORVASTATINE LDM 80mg).

#### 2.2.2.3-Pelliculage

Opadry blanc (YS-1-7040).

### 2.2.3-Indications d'utilisation

Utilisé pour les maladies d'Hypercholestérolémie.ATORVASTATINE est indiqué en complément d'un régime alimentaire adapté pour diminuer des taux élevés de cholestérol total (total-C) et le LDL cholestérol (LDL-C).De plus il prévient les maladies cardiovasculaires.



### **2.2.4-Association avec d'autres médicaments**

Le risque de rhabdomyolyse est majoré lorsque l'atorvastatine est administrée en association avec certains médicaments qui peuvent augmenter la concentration plasmatique de l'atorvastatine, tels que les inhibiteurs puissants du CYP3A4 ou les transporteurs protéiques.

## **2.3- Contrôle de la qualité pharmaceutique**

L'industrie pharmaceutique doit fabriquer et fournir des médicaments adaptés à l'emploi, répondant aux exigences du dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM) et n'exposant les utilisateurs à aucun risque lié à des carences en matière de sécurité, de qualité, ou d'efficacité. La réalisation de cet objectif de qualité engage la responsabilité de l'entreprise. Elle requiert la participation et l'engagement du personnel dans les différents départements et à tous les niveaux de l'entreprise, de ses fournisseurs et des distributeurs. Pour atteindre plus sûrement cet objectif, l'entreprise doit posséder un système d'assurance de la qualité, bien conçu, correctement mis en œuvre et effectivement contrôlé, système qui inclut le concept des domaines de fabrication et ses règles de fonctionnement constitue le moteur de la qualité dans l'industrie pharmaceutique.

### **2.3.1- Définition de la qualité**

Selon l'organisation internationale de normalisation (ISO), la qualité est : « l'ensemble des caractéristiques d'une entité qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés et implicites » (Willya, 1996).

### **2.3.2-Facteurs de maîtrise**

Tests en laboratoire d'échantillons de médicaments comparé à des références de qualité reconnue.

Les facteurs à maîtriser avant la validation relèvent du système assurance qualité mis en place au laboratoire de contrôle de qualité sont :

- 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.

## 2.3.3- Les modalités de maîtrise des risques "5M"

La notion de "validation de méthode" découle directement du concept de Qualité (Assurance qualité ; gestion des risques, HACCP...etc.). Elle est en relation directe avec les concepts de bonnes pratiques de fabrication (BPF), spécialement élaborées pour l'industrie pharmaceutique et les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) (Ducellier, 2013).

Avant d'entamer la validation, il est indispensable de faire une étude des risques associés à l'analyse et définir les risques critiques, c'est-à-dire ceux qui peuvent perturber le résultat rendu au patient ou la prise en charge ultérieure de celui-ci. La méthodologie proposée est la méthode des 5M appelé également diagramme de causes et effets ou diagramme d'Ishikawa ou diagramme en arêtes de poisson qui est utilisé après un remue-méninge pour trier toutes les idées et les ranger (Figure 5).

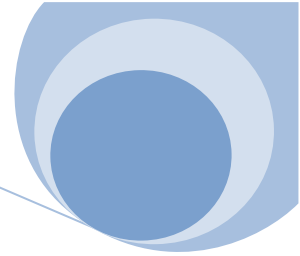
Le diagramme en arêtes de poisson est le fruit de Karou Ishikawa ingénieur chimiste japonais précurseur et un des théoriciens pour la gestion de la qualité (Saverino, 2011).

✚ Chaque famille commence en effet par la lettre M

- Main d'œuvre : compétences.
- Matière : matérielle ou immatérielle (information).
- Méthode : procédure de travail.
- Milieu : environnement (température, hygrométrie, ...).
- Moyen : machine.

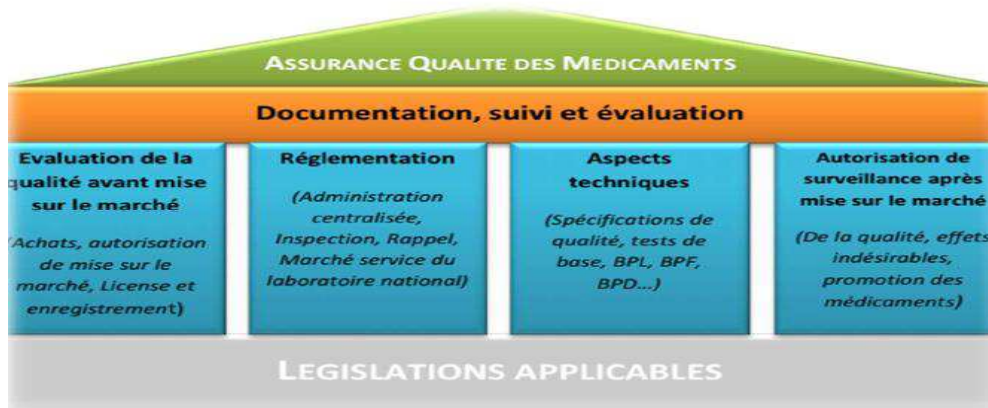


Figure 5 : Principaux facteurs de variations d'une analyse (Hubert Bazin).



## 2.3.4-L'assurance qualité

L'assurance qualité des médicaments regroupe toutes les mesures prises pour garantir qu'un médicament est sûr, efficace et en bonne qualité (acceptable pour le patient) (Figure 6) (**Management sciences for health, 1997**).



**Figure 6** : Structure de l'Assurance Qualité des médicaments (**Keravec, 2004**).

Les contrôles sont des procédures (protocoles techniques standardisés et enregistrés) définis pour l'acceptation ou le refus des produits.

Ils permettent de vérifier que des caractéristiques sont conformes à des spécifications préétablis. Les contrôles se font (**Bonnet, 2007**) :

- En Amont de la production** → **La matière première**
- En Cours de fabrication** → **Etapes intermédiaires**
- En Fin de fabrication** → **Sur produit finis**

## 2.3.5-Les bonnes pratiques de fabrication

Les bonnes pratiques de fabrication (BPF), s'appliquent aux étapes du cycle de vie du médicament, depuis la fabrication des médicaments expérimentaux, le transfert de technologie, la fabrication commerciale jusqu'à l'arrêt du produit.

## 2.3.6- 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. Les essais microbiologiques ont été conçus pour le dénombrement des bactéries mésophiles, des moisissures et des levures capables de croître en aérobiose. Ces essais font l'objet d'une monographie de la pharmacopée. Le choix de la méthode est déterminé par des facteurs, tels que la nature du produit et le nombre de microorganismes présumé. Quelque soit la méthode choisie, elle doit être convenablement validée (**Pharmacopée européenne 9.2**).

## 2.4- La validation

### 2.4.1-Définition

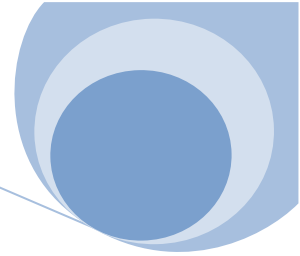
Selon La FDA (Food and Drug Administration) et les BPFs, la validation est l'établissement de la preuve que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats 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, on peut la définir aussi selon ISO 17025 comme « une confirmation par examens et apport de preuves objectives ».

Aussi selon OMS comme « Processus documenté démontrant qu'une méthode analytique convient bien à l'usage voulu ».La FDA (U.S Food AND Drug) considère la validation comme établir à l'évidence, avec un degré de confiance élevée et sous une forme documentée, qu'un procédé déterminé permet d'obtenir un produit (ou service) qui atteint des spécifications définies à l'avance.

### 2.4.2- La validation dans l'industrie pharmaceutique

La validation est développée pendant ces dernières années. 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 European Medicine Agency (EMA), la Food and Drug Administration (FDA), ou encore les Pharmacopées pour définir les responsabilités relatives à la validation. C'est pour ça elle était souvent considérée comme un fardeau. Malgré les critiques initiales, la validation de procédé pharmaceutique est maintenant bien acceptée et considérée comme une partie de la gestion de qualité. L'avenir de la validation de procédé est d'un grand intérêt, particulièrement avec l'expansion mondiale de la fabrication pharmaceutique et le désir de normes et des exigences internationales harmonisées.



## 2.4.3-Cycle de vie d'une méthode d'analyse

Les méthodes d'analyse sont souvent décrites comme des procédures immuables et figées. C'est un peu l'impression que donnent les manuels et les autres recueils de normes techniques.

Or, comme tout procédé de production, les méthodes d'analyse naissent puis évoluent puis meurent. Pour comprendre clairement le rôle et la place de la validation dans la vie d'une méthode d'analyse, il est intéressant de décrire son cycle de vie depuis le moment où elle est choisie jusqu'au moment où on l'abandonne (FEINBERG, 2009).

La mise en œuvre de ces méthodes (le cycle de vie) peut s'articuler en quatre grandes phases généralement successives (Figure 7) :

1. Une phase de Sélection : où des objectifs et des conditions opératoires initiales sont définis.
2. Une phase de développement : avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences;
3. Une phase de validation : (Validation Interne/Externe) précédée, selon les cas, d'une phase de pré-validation.
4. Une phase d'application en routine : incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle ou une revalidation.

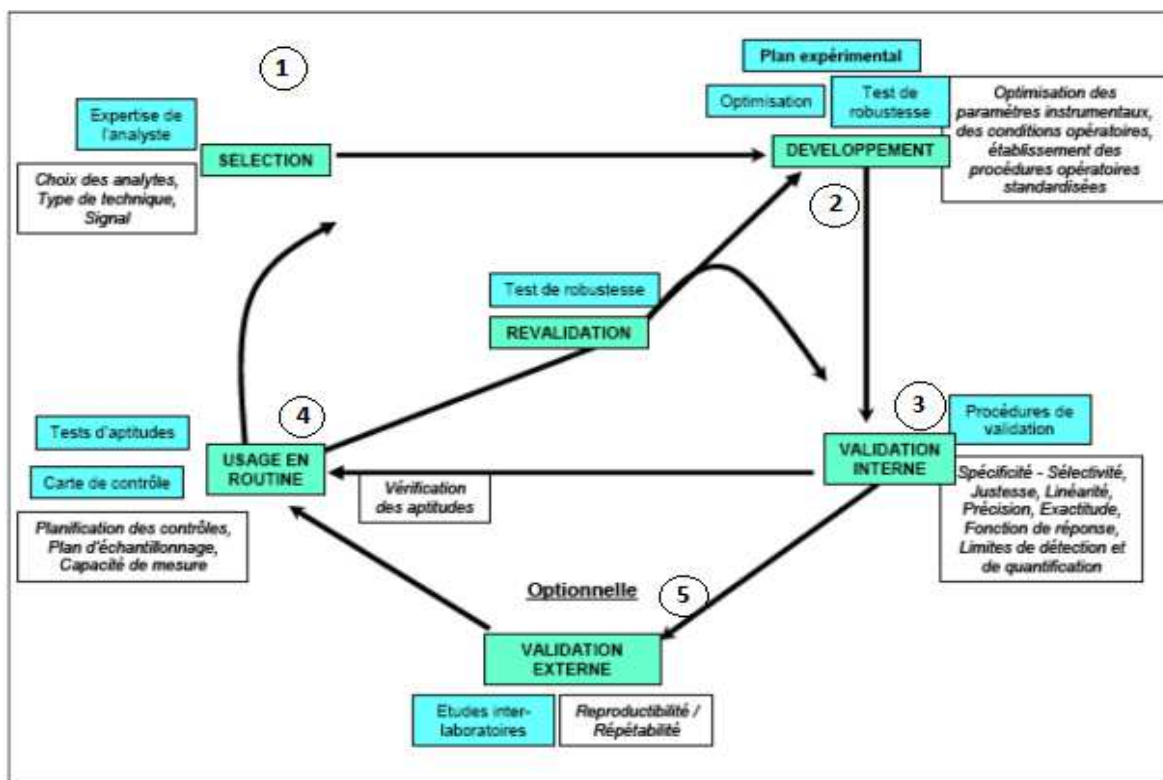
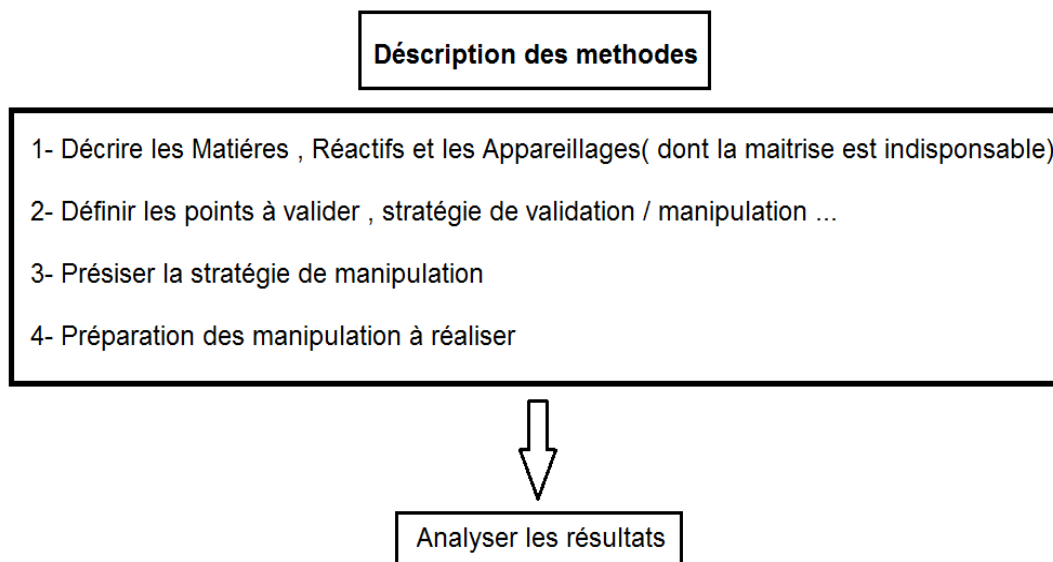


Figure 7 : Cycle de vie d'une méthode analytique (Marini, 2006) .



### 2.4.3.1-Processus de validation

Dans le domaine de la validation, deux types de méthodes sont mentionnés : les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives. Dans cette dernière catégorie, la mise en œuvre de ces méthodes (le cycle de vie) peut s'articuler en quatre grandes phases généralement successives (Figure 8).



**Figure 8** : processus de validation dans un laboratoire de contrôle qualité.

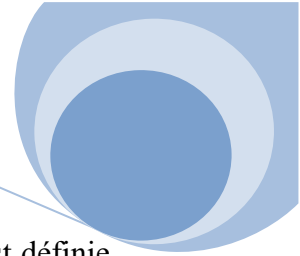
### 2.4.4-Types de validation dans l'industrie pharmaceutique

La validation d'une méthode d'analyse dans l'industrie pharmaceutique peut être prospective, ou rétrospective ou bien simultanée.

#### 2.4.4.1-Validation prospective

C'est une validation effectuée avant la production de routine de produits destinés à la vente ou sur un produit fabriqué selon un procédé modifié, comportant des modifications importantes pouvant se répercuter sur les caractéristiques du produit .Elle englobe (Raynaud ,2011) :

- les étapes initiales d'élaboration de la formulation, du procédé et des spécifications du procédé .
- l'élaboration des méthodes d'analyse en cours de fabrication et des plans d'échantillonnage
- la constitution des dossiers de lot de fabrication .
- la définition des spécifications des matières premières .
- le transfert de la technologie des lots de mise à l'échelle à des lots à l'échelle commerciale.
- l'énumération des contrôles applicables aux principaux équipements et à l'environnement.



### 2.4.4.2-Validation rétrospective

La validation rétrospective est réalisée pour un médicament déjà commercialisé et est définie comme l'établissement de la preuve documentée qu'un système fait ce qu'il prétend faire, « sur la base des données relatives à la fabrication, aux essais et au contrôle du lot » .

Cette revue de toute la fabrication antérieure évalue les données dans le but de prouver que le processus est toujours sous contrôle.

Elle peut être utilisée pour les procédés bien établis qui ont été utilisés sans aucun changement majeur qui affecte les attributs qualité critiques du produit (par exemple : changement de matière première, équipement, système...) (**Raynaud ,2011**).

### 2.4.4.3-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 (**Raynaud, 2011**).

### 2.4.4.4-Revalidation

Une fois la validation est 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.

- 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.

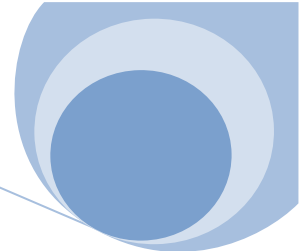
## 2.4.5- Critères de performances d'une méthode microbiologique

### 2.4.5.1-Limite de détection de la méthode

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

Elle est basée sur l'analyse statistique de la différence de signaux observés « blancs et les échantillons ».

La limite de détection est définie dans la méthode de référence normalisée de la pharmacopée.



### 2.4.5.2- 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 limite 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.

➤ **La limite supérieure** de quantification est la valeur au-delà de laquelle un dénombrement sur membrane ou gélose est fiable.

➤ **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.

### 2.4.5.3-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 tests) dans des conditions déterminées.

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

#### ✓ Répétabilité

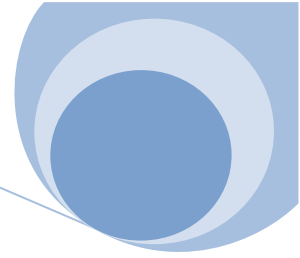
La répétabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenue pour le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dans les mêmes conditions : même technicien, mêmes lot de réactifs, même instrument, même lot de milieu de culture, même incubateur, même jour d'analyse (délai le plus court possible).

Son 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 suivants : 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.



### 2.5- Validation des méthodes d'analyses microbiologiques

La validation ou bien l'applicabilité des méthodes d'analyses microbiologiques va être selon la pharmacopée européenne.

La validation est applicable par une contamination artificielle des produits non stériles « une confirmation par des preuves objectives que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévues ont été satisfaites » (Baumgartner et al., 2017).

#### 2.5.1- Paramètres de validation d'une méthode

La validation est déterminée par la question de base que pose la méthode (PMEII/UNOP, 2013) soit :

##### 2.5.1.1-Analyse qualitative (décision oui / non)

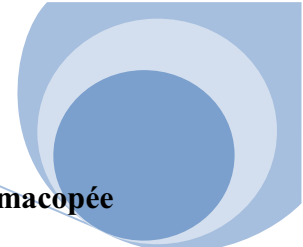
La question est de savoir si un organisme est présent dans une matrice donnée ou non (exemple détection de micro-organismes pathogène).

##### 2.5.1.2-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.

#### 2.5.2- Indicateurs à contrôler lors d'une validation

- ✓ **Propreté de l'environnement** : à vérifier pendant chaque manipulation soit sous PSM (poste de sécurité microbien) ou devant les becs Benzen.
- ✓ **Qualités nutritives des milieux de culture** : éprouvées par des tests de fertilité (validation des milieux de culture).
- ✓ **Présence potentielle d'agents interférant dans le produit** : appelé également inhibiteurs intrinsèque (ont une activité Antimicrobienne), éliminée en utilisant des neutralisants (tableau 2) (Pharmacopée européenne 9.2).



**Tableau 2 : Agents usuels de neutralisation des substances interférentes (Pharmacopée européenne 9.2).**

<u>Substance interférente</u>	<u>Méthode de neutralisation possible</u>
Glutaraldéhyde, mercuriels	Hydrogénosulfite de sodium (bisulfite de sodium)
Phénolique, alcool, aldéhydes, sorbate	Dilution
Aldéhydes	Glucine
Ammoniums quaternaires (QAC), parahydroxybenzoates (parabènes), bis-biguanides	Lécithine
QAC, lode, parabène	<b>Polysorbate (Tween)</b>
Mercuriels	Thiglycolate
EDTA (édétate)	Ions $Mg^{2+}$ ou $Ca^{2+}$

### 2.5.3-Contamination microbienne d'un produit pharmaceutique

La contamination microbienne est un sujet de préoccupation des industries pharmaceutiques depuis de nombreuses années. Il est aujourd'hui d'autant plus que de nouvelles exigences réglementaires sont récemment entrées en application (**Pharmacopée européenne 9ème, 2017**).

### 2.5.4-Représentation des souches utilisées dans la validation microbiologique de l'ATORVASTATINE (80mg)

L'utilisation de ces souches parmi d'autres fait références aux exigences de la pharmacopée européenne et le dossier technique, aussi par rapport à leurs places vedettes comme représentants de différent monde de microorganismes.

## Revue Bibliographique

-*Candida albicans* : représente le monde des levures, elle est un agent pathogène fongique opportuniste responsable de la candidose chez l'hôte humain.

-*Aspergillus brasiliensis* : réfère le monde des moisissures, elle est isolée dans des substrats variés comme : sol, bois, eau, légumes, fruits, noix, poussières, plastiques, cuir, métaux, textile.

-*Bacillus subtilis* : est une bactérie gram positif qui se trouve dans le sol et le tractus gastro-intestinal des ruminants et des humains.

-*Pseudomonas aeruginosa* : Il représente généralement la contamination hydrique, sa présence dans les produits indique généralement la contamination de l'eau.

-*Staphylococcus aureus* : Un commensale de l'homme et se révèle pathogène opportuniste dans certains emplacements ou dans certaines circonstances.

-*Escherichia coli* : est une bactérie qu'on trouve normalement dans les intestins des humains et des animaux.

-*Salmonelle*: une bactérie principalement d'origine alimentaire trouvée en raison de la pollution fécale dans la chaîne d'approvisionnement, elle est très dangereuse qui peut être mortelle.

### 2.6- Présentation du laboratoire de Diagnostic Magrébins (LDM)

#### 2.6.1-Définition

Le laboratoire de diagnostic maghrébin (figure 9) est une entreprise de production et d'importation de produits pharmaceutiques situé à Constantine exactement à la zone industrielle Oued Hamimime- El Khroub. Il est fondé en 1997 par les frères El Ammouchi et son PDG actuel est Mouhammed El Ammouchi, son activité consiste en l'importation et la production de produits pharmaceutiques à usage humains.



Figure 9 : Le logo du Laboratoire du Diagnostic Magrébins (LDM)

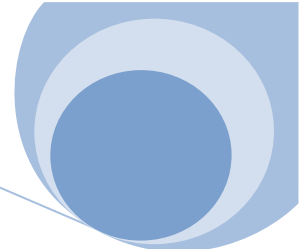
#### 2.6.2-Activités du groupe LDM

- Production de produits pharmaceutiques LDM à usage humain .
- Production et commercialisation de médicaments sous licence du laboratoire GlaxoSmithKline (GSK) « Panadol Extra 1g rhume-grippe ».
- Production par contrat de sous-traitance avec plusieurs laboratoires pharmaceutiques comme : GSK(GlaxoSmithKline), PHARMETHIC, SANOFI, SERVIER, TABOUK.

##### 2.6.2.1-Classes thérapeutiques et médicaments

Les classes thérapeutiques sont les suivants :

- |   |                                 |
|---|---------------------------------|
| - Antipsychotiques                        | - Antihypertenseurs             |
| - Les Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens | - Les Antiagrégant plaquettaire |
| - Les Antispasmodiques                    | - Les Antifongiques             |
| - Les hypolipidémiants                    | - Les Antipyrétiques            |
| -Les Anti-angoreux                        | - Les Antiépileptique           |



**Tableau 3:** Liste de médicaments produits par LDM.

<b>NOM DE SPECIALITE DU PRODUIT</b>
LOSARTAN LDM®50mg
LOSARTAN LDM®100mg
<b>ATORVASTATINE LDM®80mg</b>
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

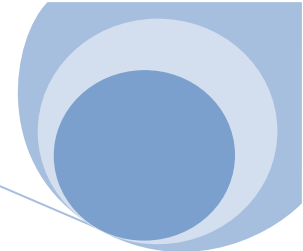


## Revue Bibliographique

### **2.6.3-Les unités du laboratoire de contrôle de qualité d' LDM**

- Laboratoire de contrôle physico-chimique central.
- Laboratoire de contrôle microbiologique central.

# **Matériel et méthodes**



### 3- Matériel et Méthodes

L'objectif de ce travail s'inscrit sur la validation d'une méthode microbiologique pour l'ATORVASTATINE (80mg). De ce fait, il est réalisé au niveau du laboratoire de diagnostics maghrébin (LDM), et plus précisément le laboratoire de microbiologie. En outre, plusieurs matériels et milieux de culture ont été utilisés. Le principe de cette étude est de démontrer que la méthode de validation utilisée nous permet de détecter une contamination provoquée par le manipulateur. Les tests de validation utilisés sont DGAT (dénombrement des germes aérobies totaux), DMLT (dénombrement des moisissures et levures totaux) et Recherche spécifique pour les germes *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonasaeruginosa* et *Salmonella abony*.

#### 3.1-L'équipements utilisés au laboratoire de microbiologie

##### 3.1.1-Généralité sur le matériel

Le laboratoire de microbiologie est partagé essentiellement en 3 Salles (salle de préparation, salle de manipulation et la salle d'incubation).Le matériel utilisé fréquemment est composé de : pipettes stériles (1 ml, 10 ml, 5 ml), micropipettes, embouts, poires, spatules, eau purifiée, eau stérile, eau de Javelle, boîtes de Pétri (90 mm, 55 mm), marqueurs, gaze, ciseaux, alcool, gants, gants stérile, charlotte, sur-chaussures et bavettes.

##### 3.1.2-Salle de préparation

Au niveau de cette salle on a procédé a toutes sortes de préparation des milieux de culture, du diluant et aussi la pesé et préparation de l'échantillonnage du produit dont, on trouve :

- A) **Autoclave** : vertical pour la stérilisation des milieux de culture qui se fait à 110 jusqu'à 120 C° pendant 10 à 30 minutes (ANNEXE 1).
- B) **Balance** : instrument de pesage de précision avec réponse ultrarapides (ANNEXE 1).

##### 3.1.3-Salle de Manipulation

C'est la salle ou l'ensemble des manipulations sont réalisées dans un environnement stérile. La salle est entièrement fermée, l'alimentation de l'enceinte en air à travers un filtre à très haute efficacité assure également la propreté de l'atmosphère par l'évacuation du flux d'air hors de l'enceinte. La salle est composée essentiellement de :

## Matériel et Méthodes

**A) Bain marie :** Les bains-marie sont des équipements de laboratoire permettant de chauffer un récipient dans un bain d'eau (ANNEXE 1).

**B) Agitateur vortex :** L'agitateur type Vortex est idéal pour l'agitation de tubes ou de petits Flacons. Il est recommandé pour la dissociation des amas cellulaires (ANNEXE1).

### 3.1.4-Salle d'Incubation:

- **Etuve** :

C'est là où on trouve différents types d'incubateurs enceinte thermostatée, utilisé pour le contrôle qualité microbiologique dans les industries. Les incubateurs permettent de maintenir de façon précise une température allant généralement jusqu'à 70 – 80 °C (ANNEXE 1).

Les étuves trouvées sont les suivantes :

-Incubateurs à 33C° : pour mise en culture et développement des germes totaux .

-Incubateurs à 43C° : pour mise en culture et développement de *Escherichia coli* (Température spécifique).

-Incubateurs à 23C° : pour mise en culture et développement des moisissures et levures.

Le contrôle de la température est assuré par un thermo-hygromètre enregistreur à l'intérieur de chaque incubateur afin de :

- Suivre la température des incubateurs au cours de leur fonctionnement.
- Prévenir en cas de panne ou un dérèglement de température.

**-Compteur de colonies** : Le compteur de colonies convient pour des comptages fiables et efficaces des colonies sur boîtes de Pétri (ANNEXE 1).

### 3.2- Milieux de cultures utilisés

Un milieu de culture est un support qui permet la culture de cellules, de bactéries, de levures, de moisissures afin de permettre leur étude. En principe, les cellules trouvent dans ce milieu les composants indispensables pour leur multiplication, mais aussi parfois des éléments qui permettront de privilégier un genre bactérien ou une famille.

Plusieurs milieux solides ou liquides ont été utilisés afin de réaliser les différents tests de ce travail et de mettre en évidence le genre bactérien qui fait référence à chaque milieu. De ce fait, on peut citer:

### **3.2.1-Solution tamponnée peptonée au chlorure de sodium pH 7 additionnée au Tween 80 (TSE+ Tween 80)**

C'est un diluant utilisé dans l'industrie pharmaceutique. Ce milieu est la formulation de la Solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0 de la Pharmacopée Européenne (2.6.13), mais avec addition de polysorbate 80 (Tween).

Le milieu avec Tween80 a un rôle dans la validation microbiologique des produits non obligatoirement stériles tel que notre médicament ATORVASTATINE, en assurant la dilution par la neutralisation de l'activité antimicrobienne du médicament.

#### **3.2.1.1-TSE (bouillon Tryptone-sel)**

Le bouillon Tryptone-sel est un diluant destiné à la préparation des dilutions décimales, utilisé en vue de contrôle qualité microbiologique des produits pharmaceutiques.

Il se compose essentiellement en Tryptone et chlorure de sodium. La Tryptone assure la revivification des microorganismes, le chlorure de sodium permet d'obtenir une solution isotonique (ANNEXE 2).

#### **3. 2.1.2-Tween 80 (Le polysorbate 80)**

Est un tensioactif et un émulsifiant non ionique souvent utilisé dans les aliments et les cosmétiques, aussi utilisé dans le contrôle qualité microbiologique des produits pharmaceutiques sous formule brute  $C_{64}H_{124}O_{26}$ . Il a un rôle d'inhibiteur de l'activité antimicrobienne du médicament permettant ainsi aux microbes de se développer.

#### **3.2.1.3- Préparation du milieu TSE+1%Tween 80**

Le TSE +1% Tween (polysorbate) est préparé par l'addition dans un erlenmeyer de 9,66 g de TSE sous forme de granules et 6ml de tween 80 qui est sous forme de liquide marron très visqueux.

## Matériel et Méthodes

Après que les deux composants seront fondus sur plaque chauffante on rajoute 600ml d'eau purifiée avec homogénéisation par l'agitateur.

Le milieu est met dans un flacon après vérification du pH qui doit être dans les environs de pH 7 neutre « L'ajustement se fait par l'ajout d'un acide ou d'une base et attendre que le pH se stabilise pour le lire correctement » .

Au final on procède a une stérilisation du milieu dans l'autoclave a une température de 121C° pendant 15 minutes.

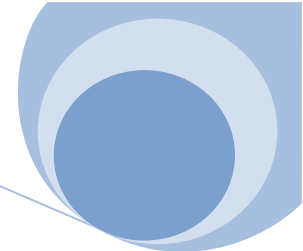
### 3.2.2- Milieu liquide aux peptones de caséine et de soja (TSB)

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 répond à la formule décrite dans les chapitres harmonisés des pharmacopées européenne et américaine. Il est ainsi utilisé comme bouillon standard à l'étape d'enrichissement dans la recherche spécifique (**biokar-diagnostics, 2009**).

Ce milieu est constitué de trois composants dont ,le glucose constitue la source énergétique, le chlorure de sodium maintient l'équilibre osmotique et le phosphate dipotassique agit comme substance tampon pour le maintien du pH .La formule-type à la composition décrite dans la Pharmacopée Européenne (**ANNEXE 2**).

### 3.2.3- La gélose Trypto-caséine soja (TSA)

Milieu universel convenant pour un large éventail d'emplois du fait de son excellente nutritivité. Il est utilisé dans le dénombrement des germes aérobies totaux, Coulé en boîtes à fond quadrillé ou sur languettes. De même il convient pour les tests rapides et examen des surfaces et constitue le milieu de référence utilisé pour l'évaluation des critères de productivité et sélectivité dans le cadre de l'application de la Spécification Technique (**Pharmacopée européenne9.Ch5.1.4**). La formule-type répond notamment à la composition décrite dans la Pharmacopée européenne (**ANNEXE 2**).



### 3.2.4- Milieu Sabouraud dextrose-gélosé (SDA)

Constitue un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes. Autrement dit, il est utilisé dans le dénombrement des moisissures et levures totales (**Pharmacopée européenne 9.2 Chapitre 5.1.4**).

Il est recommandé dans les contrôles de stérilité des produits pharmaceutiques, cosmétiques ou alimentaires. La formule-type répond notamment à la composition décrite dans la Pharmacopée européenne (**ANNEXE 2**).

### 3.2.5- Milieu liquide de MacConkey (MCB)

Le MCB est utilisé dans l'étape de « subculture » de *Escherichia coli*, manifesté par un trouble de couleur des flacons après 24h d'incubation à 33-34°C (**Pharmacopée européenne Chapitre 9.2 5.1.4**).

La présence de bile purifiée inhibe la croissance des microorganismes à Gram positif. 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). Le bouillon de MacConkey répond à la formule décrite dans la Pharmacopée Européenne pour la recherche des *Escherichia coli* (**ANNEXE 3**).

### 3.2.6- Milieu gélosé de MacConkey (MCA)

Milieu sélectif utilisé pour l'isolement des bactéries comme *Escherichia coli* dans les eaux, les produits alimentaires, les produits pharmaceutiques et biologiques d'origine animale. Sa formule est recommandée dans les Pharmacopées européenne et américaine pour le contrôle des contaminations microbiennes (**Pharmacopée européenne 9.2 Chapitre 5.1.4**). Le MCA est utilisé pour l'étape de repiquage et identification d'*Escherichia coli*, de cocco-bacille le résultat de couleur rose du milieu confirme un résultat positif. La formule-type répond notamment à la composition décrite dans la Pharmacopée européenne (**ANNEXE 3**).

### 3.2.7- Milieu liquide d'enrichissement des Salmonelles Rappaport-Vassiliadis (RVB)

Il est utilisé pour l'enrichissement sélectif des *Salmonella* (subculture) avant de passer à l'étape de repiquage des *Salmonella* sur milieu XLD. La forte concentration en chlorure de magnésium ainsi que la présence de vert de malachites ralentissent la croissance des germes autres que les *Salmonella*, par un virage de couleur en bleu-clair (**biokar-diagnostics, 2009**).

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

### 3.2.8- Milieu gélosé xylose-lysine-désoxycholate (XLD)

Utilisé pour l'isolement des *Salmonella* (étape de repiquage) dans les produits pharmaceutiques. Le désoxycholate de sodium assure l'inhibition de la flore contaminante à Gram positif. Les colonies qui se développent sont des Bacille de couleur rose, en présence de l'indicateur, le rouge de phénol (**Pharmacopée européenne 9.2 Chapitre 5.1.4**). La formule-type répond notamment à la composition décrite dans la Pharmacopée européenne ( **ANNEXE 4**).

### 3.2.9- Milieu gélosé-cétrimide

Utilisé pour l'isolement « repiquage » sélectif de *Pseudomonas aeruginosa* visant à stimuler la production de pyocyanine de *Pseudomonas aeruginosa* et l'inhibition sélective de microorganismes autres que cette bactérie. Une pigmentation caractéristique bleu ou bleu-vert et une fluorescence sous ultraviolets à 254 nm oriente vers *Pseudomonas aeruginosa* (**Pharmacopée européenne 9.2 Chapitre 5.1.4**). La formule-type répond notamment à la composition décrite dans la Pharmacopée européenne (**ANNEXE 5**).

### 3.2.10- Milieu gélosé mannitol-sel (Chapman)

Milieu sélectif des bactéries halophiles et plus particulièrement fermentant le mannitol. C'est un milieu semi-synthétique, il est utilisé pour l'isolement des *Staphylococcus aureus*. La forte concentration en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plupart des bactéries autres que les staphylocoques, alors que la fermentation du mannitol est mise en évidence par le virage au jaune de l'indicateur pH (rouge de phénol) (**Pharmacopée européenne 9.2 Chapitre**



5.1.4). La formule-type répond notamment à la composition décrite dans la Pharmacopée européenne ( ANNEXE 6).

### 3.3- Produit à étudier

Le produit utilisé dans cette validation est ATORVASTATINE (80mg) (figure 10), qui est de type statine (anti-hypercholestérolémie) utilisé pour son action hypocholestérolémiante. Les prélèvements ont été réalisés à partir des trois lots de différents cartons (début, milieu et fin de chaque lot) afin d'assurer la représentation homogène de tout le lot. Les informations du produit sont mentionnées dans le Tableau 4.



Figure 10 : représentation de la boîte et blister (ATORVASTATINE).

Tableau 4 : information sur le produit ATORVASTATINE (80mg).

<b>DCI</b> (denomination commune international )	ATORVASTATINE calciumtrihydraté
<b>Forme</b>	Comprimé pelliculés
<b>Dosage</b>	80 mg
<b>Lots prélevés</b>	8224. 8225. 8226

### 3.4- Paramètres de validation microbiologique à étudier

L'ensemble des tests de validation utilisés sont réalisés en respectant les références de validation microbiologique « critères d'acceptation » (partie matériel et méthodes ; Section 3.5) imposées par la pharmacopée européenne (chapitre 5.1.4) pour les DMLT (dénombrement moisissures levures totaux), DGAT (dénombrement germes aérobie totaux) et recherche de *Escherichia coli*. Aussi celles imposées par le dossier technique en ce qui concerne DGAT, DMLT, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella abony* (Tableau 5).

**Tableau 5** : Paramètres de validation (Pharmacopée européenne 9.2) et Dossier technique.

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>Staphylococcus aureus</i>	Absence/g
Recherche <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Absence/g
Recherche de <i>Salmonella</i>	Absence/10g

### 3.4.1-Dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT)

#### 3.4.1.1- Principe

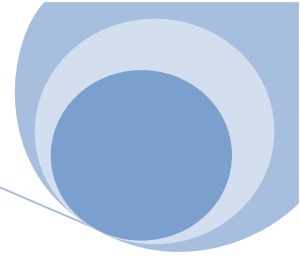
Il est réalisé pour déterminer si la qualité microbiologique d'une substance ou d'une préparation est satisfaisante (par la méthode d'ensemencement en profondeur « dénombrement sur boîtes ») éventuellement sous certaines conditions de température l'incubation à 33C° pendant 3 jours. La culture se fait sur milieu gélosé aux peptones de caséine (TSA).

Autrement, le test DGAT est un challenge test ou on doit avoir une concentration en UFC (unité formant colonies) représenté par le facteur deux « limite de détection située entre une limite supérieure et autre inférieure qui est le taux de recouvrement » (Acadpharm ,2016).

#### 3.4.1.2-Les souches microbiennes utilisées pour la validation du DGAT

Dans le dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) on utilise :

- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027).
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).
- *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).
- *Candida albicans* (ATCC 10231).
- *Aspergillus brasiliensis* (ATCC16404).



### 3.4.2-Dénombrement des moisissures/levures totales (DMLT)

#### 3.4.2.1-Principe

Il est réalisé pour déterminer si la qualité microbiologique d'une substance ou d'une préparation est satisfaisante par le même principe que la DGAT. L'incubation est réalisée sous température de 23C° pendant 5 jours. La culture est réalisée sur milieu Sabouraud dextrosé-gélosé (SDA). Le but du test est avoir un facteur deux « limite de détection située entre une limite supérieure et autre inférieure qui est le taux de recouvrement » (Acadpharm, 2016).

#### 3.4.2.2-Les souches utilisées pour la validation DMLT

Dans le dénombrement des moisissures/levures totales (DMLT) on utilise :

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

### 3.4.3-Recherches spécifiques

Le but de la recherche spécifique est de démontrer si un produit contient ou pas un microorganisme pathogène spécifique.

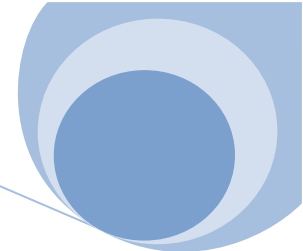
#### 3.4.3.1-Principe

La recherche spécifique dépend de la toxicité des microorganismes soit absence/g par rapport à une faible toxicité, ou bien absence/10g cas d'un fort pouvoir toxique.

#### 3.4.3.2- Les souches microbiennes utilisées

La recherche spécifique est effectuée en utilisant les souches suivantes :

- Recherche de *Escherichia-coli* par la souche *Escherichia coli* ATCC 8739.
- Recherche de *Salmonella* par la souche *Salmonella abony* NCTC6017.
- Recherche de *Pseudomonas aeruginosa* par la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027.
- Recherche de *Staphylococcus aureus* par la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.



### 3.5- Normes d'acceptation de la validation

Suivant la pharmacopée européenne et le dossier technique, l'acceptation de validation des méthodes microbiologiques se fait suivant deux paramètres comme décrit dans la rubrique revue bibliographique (section 2.5.1).

#### 3.5.1- Limite d'acceptation dénombrement DGAT, DMLT

La limite d'acceptation pour les validations de la DGAT et DMLT dans les validations des méthodes d'analyse est entre 0.5 à 2.0 « Cette limite est de facteur deux c'est-à-dire que le résultat du dénombrement microbien du contrôle positif est le double ou la moitié par rapport à celui du témoin positif ».Le résultat doit être conforme pour tous les germes pour que la dilution testée peut être validée soit :

- **AJUSTEMENT D** = Contrôle positif – Contrôle négatif (C-) (**section 3.7.1**)
- **TAUX DE RECOUVREMENT** = Ajustement D/ Moyenne dénombrement Témoin positif (T+) qui doit être compris entre 0,5 et 2,00 (**Pharmacopée européenne 9.2 Chapitre 2.6.12, 2.6.13**).

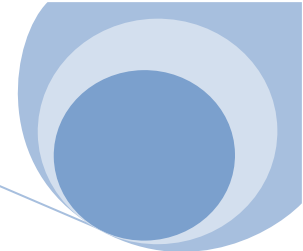
#### 3.5.2- Critères d'acceptation pour la recherche spécifique

Vérifier la présence ou absence des souches de référence par l'aspect macroscopique des colonies qui doit être comparable sur le témoin positif en absence de produit et celui du contrôle positif en présence de produit (**Pharmacopée européenne 9.2 Chapitre 2.6.12 , 2.6.13**).

### 3.6- Calibrage des souches

#### 3.6.1-Calibrage 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 concentration en microorganismes dans la méthode de validation microbiologique, mais aussi dans d'autre domaine (validation des milieux de culture...).



### Opération : Réactifs et milieux de culture

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

### 3.6.2-Protocole de calibrage

Il est effectué par l'utilisation des souches de références, avec le prélèvement d'une jeune colonie récente si possible pour la mettre dans un tube qui contient 10 ml TSE en homogénéisant la solution.

Des dilutions décimales sont utilisées en transférant 1 ml de la solution mère dans 09 ml de TSE stérile. par la suite, on doit homogénéiser et refaire l'opération pour avoir des dilutions inférieurs, puis 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. L'Incubation de chaque boîte de gélose nutritive est réalisée à 33°C pendant 18 heures. les suspensions microbiennes sont stockées au frigo entre 2-8°C pendant 24 heures pour refaire les tests si nécessaire. La lecture se fait grâce au compteur de colonies afin de choisir les boîtes qui ont la bonne concentration en UFC, et comme on a ensemencé 0.1ml de chaque souche on doit choisir la dilution qui nous a donné  $\leq 1000$  colonies Tableau 6.

**Tableau 6** : Les dilutions idéales trouvées lors du calibrage des souches.

<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Salmonella abony</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	<i>Candida albicans</i>
10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-3</sup>

### 3.7- Protocole de la validation microbiologique

Avant de lancer les trois lots de l'ATORVASTATINE 80mg pour leurs validation, on a bien lancé des essais sur le même médicament dans une étape de recherche et développent une méthode adéquate pour une validation selon les normes. La méthode de préparation des échantillons dépend des caractéristiques chimiques de notre produit, qui est hydrosoluble dans l'eau. On outre, il a été remarqué qu'il contient des effets antimicrobiens. De ce fait l'ajout d'un neutralisant (tel que Tween80 « qui est un neutralisant standard » avec une certaine

## Matériel et Méthodes

concentration sera nécessaire). Plusieurs essais (jusqu'aux 4 essais) ont été lancés afin de choisir la bonne concentration de ce dernier. Dans une première expérience on a effectué nos tests sur la solution mère ( $10^{-1}$ g/ml ; 10g de produit dans 90ml du diluant TSE) sans l'ajout de neutralisant, dans une deuxième expérience on a dilué à  $10^{-2}$ g/ml sans ajout du neutralisant, puis dans une troisième expérience avec addition de 0,5% de polysorbate (Tween80) et finalement dans une quatrième expérience on a utilisé la dilution  $10^{-2}$ g/ml avec addition de 1% du même neutralisant (Tableau 7). Finalement on a établi un protocole de validation pour les paramètres (de DGAT et DMLT) qui respecte les critères d'acceptation avec une dilution de  $10^{-2}$ g/ml et 1% de polysorbate.

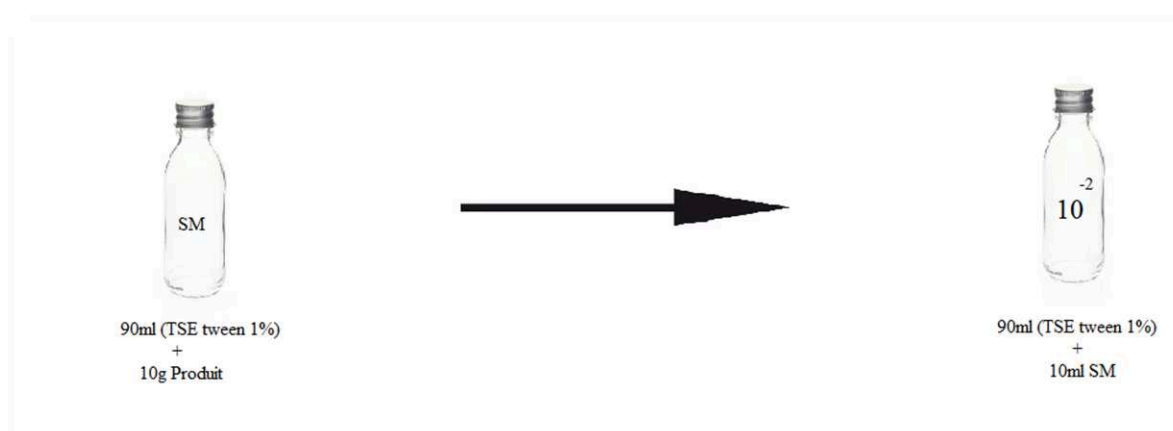
**Tableau 7 :** Dilutions et concentrations de neutralisant testées

Paramètres de recherche	Dilution testée	Neutralisant
DGAT et DMLT	solution mère ( $10^{-1}$ g/ml) Et ( $10^{-2}$ g/ml)	de 0,5% de polysorbate et <b>1% de polysorbate (Tween80)</b>

### 3.7.1- Protocol paramètres du dénombrement DGAT, DMLT

#### 3.7.1.1- Manipulation effectuée

Pour les tests des paramètres de dénombrement DGAT, DMLT, le produit il est diluer 10g (9 comprimés) ATORVASTATINE (80mg) dans 90ml de diluant (TSE tween 1%). Ensuite prélever 10ml de la solution mère et la versé dans un flacon contiens 90ml de TSE+Tween1%, Bien vortexer les deux préparations (figure 11).



**Figure 11 :** préparation de la solution mère avec la première dilution décimale.

## Matériel et Méthodes

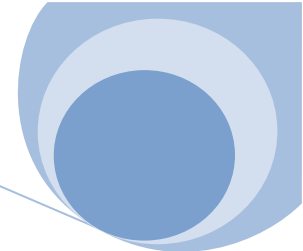
Pour cela le dénombrement s'effectue en quatre tests différents :

- Le **contrôle négatif (essai)** se compose du produit qui est notre échantillon (diluant+Médicament) et le milieu de culture, mais sans l'ajout de souches de références pour chaque lot.  
Le but est de vérifier la pureté du médicament avant de le contaminé.
- Le **témoin négatif** : se fait de la même manière mais sans ajouter le produit (médicament) ni les souches de références. il se compose du milieu de culture seulement.  
Le but est de vérifier la pureté et la stérilité du milieu de culture.
- Le **témoin positif** : se compose du diluant, souche de référence et milieu de culture mais sans l'ajout du produit (médicament).  
Le but est de contaminer le diluant avec la bonne méthode et de dénombrer les colonies afin de calculer le taux de recouvrement.
- Le **contrôle positif** : se fait de la même manière que les tests précédents, mais en présence de produit et des souches de référence avec le milieu de culture.  
Le but est de contaminer le produit avec la bonne méthode et de faire un dénombrement afin d'avoir son ajustement et après calculer le taux de recouvrement.
- Le **nombre de répétitions** c'est trois fois (sur trois lots différents), et pour chaque souche de référence deux boites de répétition (témoin positif, contrôle positif et contrôle négatif).

### 3.7.1.2- protocole du dénombrement du DGAT

Pour cette méthode on a suivi les étapes décrites en dessous :

- Préparer deux boites de Pétri de 90mm pour chaque test.
- Introduire dans chaque boite de Pétri 1ml de l'échantillon préparé (diluant avec produit) et dans une autre le diluant.
- Pour les échantillons contaminés (**Témoin positif et Essais positifs**), inoculer 0,01ml des suspensions microbiennes.
- 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 » ou « 8 ».
- Inverser les boites et les incubé à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 3 jours.



### 3.7.1.3- protocole du dénombrement du DMLT

Pour cette méthode on a :

- Préparer deux boîtes de Pétri de 90mm pour chaque contrôle.
- Introduire dans chaque boîte de Pétri 1ml de chaque échantillon préparé et dans une autre boîte le diluant.
- Pour les échantillons contaminés (**Témoin positif et Essais positifs**), inoculer 0,01ml des suspensions microbiennes.
- Ajouter 15-20 ml du milieu gélosé liquéfié (SDA) et maintenu en surfusion à 45°C.
- 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.

### 3.7.2- Protocol de la recherche spécifique

Pour le paramètre de la recherche spécifique les résultats réfèrent a deux critères de base.

Le premier critère est par rapport à leurs toxicité faible, l'absence de contaminant par rapport a 1g de produit (Absence/g) (utiliser la solution mère TSE+1g de produit pour chaque souche, comme la dilution a tester)., concerne les souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Ces tests sont effectués en trois étapes « enrichissement, subculture et repiquage » pour *Escherichia coli* et en deux étapes « enrichissement et repiquage » pour les souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Le deuxième critère de recherche est l'absence/10g pour la souche *Salmonella*, par rapport a son grand pouvoir toxique (utiliser la solution mère TSB+10g de produit, comme la dilution a testé). Le test de recherche se fait en trois étapes « enrichissement, subculture et repiquage ».

#### 3.7.2.1- Recherche de *Escherichia coli*

- **Préparation des échantillons et enrichissement**

- Ensemencer 100 ml du milieu liquide TSB avec 10 ml de diluant(TSE1%Tween) contaminé par 0,01ml de la souche microbienne pour effectuer le témoin positif.
- Pour les échantillons contaminés ensemencer ceux qui contiennent la suspension microbienne de *Escherichia coli* seulement par 0,01 ml (contrôle positif).
- Homogénéiser et incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-24 heures.



- **Subculture et repiquage**

- Agiter le récipient d'enrichissement, puis transférer 1ml du contenu dans 100ml de milieu MCB.
- Incuber les flacons à 42-44°C (médiane 43°C) pendant 24-48 heures.
- Repiquer la subculture sur milieu MCA. L'incubation se fait à 30-35°C (médiane 33°C) de 18-72 heures.
- la boîte du témoin négatif contenant le milieu MCA seulement pour s'assurer de la stérilité de ce dernier.

### 3.7.2.2- Recherche de *Staphylococcus aureus*

- **Préparation des échantillons et enrichissement**

- Ensemencer 100 ml du milieu liquide TSB avec 10 ml de diluant contaminé par 0,01ml de la souche microbienne pour effectuer le témoin positif.
- Pour les échantillons contaminés ensemencer 0,01ml de la suspension microbienne de *Staphylococcus aureus* seulement (contrôle positif) dans 10ml d'échantillon.
- Homogénéiser et incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-24 heures.

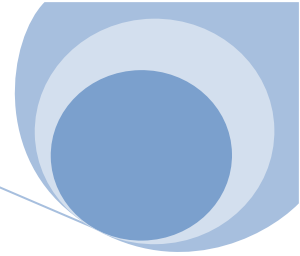
- **Repiquage**

- préparer 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 sont retournées ainsi la boîte du témoin négatif contenant le milieu Chapman seulement pour s'assurer de la stérilité de ce dernier.

### 3.7.2.3- Recherche de *Pseudomonas aeruginosa*

- **Préparation de l'échantillon et enrichissement**

- Ensemencer 10 ml de l'échantillon préparé dans 100ml du milieu liquide TSB.
- Pour les échantillons contaminés ensemencer 0,01ml de la suspension microbienne de *Pseudomonas aeruginosa* seulement.
- Homogénéiser et incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-24 heures.



- **Repiquage**

- préparer une boîte Pétri du milieu Cétrimide.
- Repiquer le résultat d'enrichissement sur milieu gélosé Cétrimide.
- Retourner les boîtes et incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-72 heures ainsi la boîte du témoin négatif contenant le milieu cétrimide seulement pour s'assurer de la stérilité de ce dernier.

### 3.7.2.4- Recherche de *Salmonella*

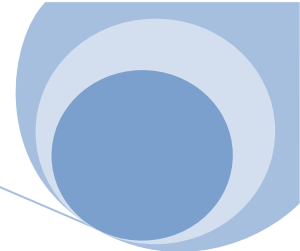
- **Préparation de l'échantillon et enrichissement**

- Préparer l'échantillon pour Salmonelle comme celui de la solution mère « préparation de l'échantillon 10g de produit dans le milieu TSB (milieu d'enrichissement et diluant au même temps) ».
- Inoculer les échantillons de 100ml à contaminés (contrôle positifs et le témoin positif) avec la souche *Salmonella* seulement.
- Incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-24 heures.

- **Subculture et repiquage**

- 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 le milieu gélosé Xylose-Lysine-désoxycholate (XLD).
- Retourner les boîtes et incuber à 30-35°C (médiane 33°C) pendant 18-48 heures ainsi la boîte du témoin négatif contenant le milieu XLD seulement pour s'assurer de la stérilité de ce dernier.

# **Résultats et Discussions**



### 4-Résultats et discussions

La validation d'une analyse microbiologique d'ATORVASTATINE 80mg est plus qu'une exigence par la pharmacopée européenne et le dossier technique mais un challenge test très délicat pour dénombrement des germes aérobies totaux (**DGAT**), dénombrement des levures et moisissure totaux(**DMLT**), ainsi que, la **recherche spécifique** qui englobe des germes spécifique suivant des critères d'acceptation. Après avoir déterminé le matériel et les méthodes de validation les résultats sont déjà présents interprétés et discutés pour arriver à établir la bonne méthode de validation de notre produit en jouant sur les paramètres et en effectuant des expériences.

Selon la pharmacopée européenne et le dossier technique. La validation des méthodes d'analyses microbiologiques implique 4 sortes de tests pour l'ensemble des paramètres de recherche **DGAT** «Dénombrement des germes aérobies totaux » **DMLT** « Dénombrement des moisissures levures totaux » et la **recherche spécifique**. Ces tests sont comme suits :

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

#### 4.1-Lancement des expériences de la validation microbiologique

Avant de lancer la validation de la méthode microbiologique des lots du médicament ATORVASTATINE 80mg, d'abord nous avons effectué des tests (4 expériences) autour du même médicament afin de trouver la méthode adéquate pour sa validation microbiologique ,que ce soit par rapport à la dilution d'échantillon prise pour le déroulement des tests et l'utilisation ou non d'un ou plusieurs neutralisants avec le pourcentage additionné au diluant si nécessaire.

##### 4.1.1- 1ère expérience

Dans la première expérience le diluant utilisé est le « TSE » sans l'ajout d'un neutralisant plus la solution mère de l'ATORVASTATINE ( $10^{-1}$  g/ml) qui est utilisée comme étant le premier échantillon à tester. Le dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux, le dénombrement des levures et moisissures totaux ainsi que la recherche spécifique vont tous être lancer au même temps dans cette expérience.

## Résultats et Discussions

### ✓ Paramètres DGAT et DMLT

Afin de valider notre produit par ces deux paramètres, il faut d'abord procéder un comptage des colonies pour chacune des boites, qui contienne le milieu TSA pour le DGAT et SDA pour DMLT. Par la suite, on doit calculer la moyenne des colonies (DGAT, DMLT)des 2 boites de gélose de chaque test effectué, selon la formule suivante :  $Nombre\ d'UFC/g = (N1+N2)/2$  ( $N1$  : nombre de germes dans la boite une et  $N2$  : nombre de germes dans la boite deux).Puis le calcul de l'AJUSTEMENT D est effectué comme suit : *moyenne contrôle positif en présence de notre échantillon – moyenne contrôle négatif en absence de notre échantillon.*

A la fin on calcule le TAUX DE RECOUVREMENT qui est : Ajustement D /moyenne du dénombrement du témoin positif en l'absence de produit (T+); et le Critère d'acceptation doit être entre l'intervalle de:  $0.50 \leq \text{recouvrement} \leq 2.00$  (Pharmacopée européenne 9.2 Chapitre 2.6.12, 2.6.13). Les résultats des tests du DGAT et DMLT sont mentionnés dans les( tableaux 8 et 9), respectivement.

**Tableau 8 :** Taux de recouvrement Dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) 1<sup>ère</sup> expérience.

DGAT	TAUX DE RECOUVREMENT					CONCLUSION
	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A. Brasiliensis</i>	
Germes						
Boite 1 (C+)	05	71	33	77	30	Résultats Non satisfaisants Dilution non retenue
Boite 2 (C+)	01	73	21	83	37	
Moyenne C+	03	72				
Boite 1 (E)	00	00	00	00	00	
Boite 2 (E)	00	00	00	00	00	
Moyenne(E)	00	00	00	00	00	
Ajustement C-E	<b>03</b>	<b>72</b>	<b>27</b>	<b>80</b>	<b>34</b>	
Boite 1 (T+)	90	88	51	107	45	
Boite 2 (T+)	78	77	42	92	39	
Moyenne T+	<b>84</b>	<b>83</b>	<b>47</b>	<b>100</b>	<b>42</b>	
<b>Recouvrement</b>	<b>0.03</b>	<b>0.86</b>	<b>0.57</b>	<b>0.8</b>	<b>0.8</b>	

C+ : le contrôle positif, E : l'essai ou Contrôle négatif, T+ : témoin positif

## Résultats et Discussions

Le taux de recouvrement pour tous les germes aérobies totaux est dans la limite d'acceptation, Sauf pour *Staphylococcus aureus* (moins de 0.5) et donc le résultat est non satisfaisant. La cause que le résultat de la souche de *Staphylococcus aureus* est **non satisfaisant** est peut être due à la dilution de solution mère ( $10^{-1}$  g/ml) testée qui est trop chargée en produit, et donc elle est non retenue.

En ce qui concerne les résultats du DMLT (tableau9), Le taux de recouvrement pour la levure *Candida albicans* n'est pas dans la limite d'acceptation (moins de 0.5) et donc le résultat est **non satisfaisant**. La cause de ce résultat pour la souche *Candida albicans* est peut-être due au même problème de la dilution ( $10^{-1}$  g/ml) qui est trop chargée en produit.

**Tableau 9:** Taux de recouvrement Dénombrement des moisissures et levures totaux (DMLT) 1<sup>ère</sup> expérience.

DMLT	TAUX DE RECOUVREMENT :		CONCLUSION
	<i>C.albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>	
Germes			
Boite 1 (C+)	50	33	Résultats Non satisfaisants Dilution Non retenue
Boite 2 (C+)	33	25	
Moyenne C+	42	29	
Boite 1 (E)	00	00	
Boite 2 (E)	00	00	
Moyenne(E)	00	00	
Ajustement C-E	<b>42</b>	<b>29</b>	
Boite 1 (T+)	96	40	
Boite 2 (T+)	90	39	
Moyenne T+	<b>93</b>	<b>40</b>	
<b>Recouvrement</b>	<b>0.45</b>	<b>0.72</b>	

C+ : le contrôle positif, E : l'essai ou Contrôle négatif, T+ : témoin positif

### ✓ Recherche spécifique

- Recherche de *Escherichia coli* par la souche *Escherichia coli* ATCC 8739.
- Recherche de *Salmonella* par la souche *Salmonella abony* NCTC6017.
- Recherche de *Pseudomonas aeruginosa* par la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027.
- Recherche de *Staphylococcus aureus* par la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

## Résultats et Discussions

- **Recherche de *Escherichia coli***

Se fait en trois étapes : la première est l'étape d'enrichissement sur milieu TSB pour avoir un bon développement de souche, la deuxième est une étape de subculture pour favoriser son développement sur milieu liquide MCB et la dernière étape est le repiquage pour avoir un bon développement de la souche en surface d'un milieu gélosé solide MCA. La recherche de ce germe est effectuée par gramme de produit et le résultat va être traduit par la présence ou absence de germe (présence dans contrôle et témoin positif et absence pour contrôle négatif).

- **Recherche de *Salmonella***

Se fait aussi en trois étapes (même étapes). sauf qu'on va utiliser cette fois ci les milieux TSB pour l'enrichissement, RVB pour la Subculture et XLD pour le repiquage. La recherche de ce germe est effectuée par 10gramme de produit et le résultat va être traduit par absence ou présence de germe (présence dans contrôle et témoin positif et absence pour contrôle négatif).

- **Recherche de *Staphylococcus aureus***

Se fait en deux étapes : la première est l'étape d'enrichissement sur milieu TSB, suivie par une étape de repiquage sur milieu gélosé solide (Chapman). Le résultat est traduit de la même manière que les germes cités au paravent (présence dans contrôle et témoin positif et absence pour contrôle négatif).

- **Recherche de *Pseudomonas aeruginosa***

Se fait en deux étapes : la première est l'étape d'enrichissement sur TSB, puis une étape de repiquage sur milieu Cetrimide. Le résultat est traduit de la même manière qu'avant.

Les résultats de la recherche spécifique par les souches de références sont résumés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 10** : résultats de la recherche spécifiques de différentes souches.

Recherche spécifique	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i>
Test	Satisfaisant	Non Satisfaisant (pas de développement dans le (T+) et (C+))	Satisfaisant	Satisfaisant

## Résultats et Discussions

Le résultat est satisfaisant pour les souches *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella* « présence des souches dans le contrôle positif (C+) et dans le témoin positif (T+) » sauf pour *Staphylococcus aureus* « absence de la souche dans le (T+) et (C+) » ce qui fait que la méthode est non valide. Le résultat non satisfaisant de *Staphylococcus* peut être reliée à l'activité antimicrobienne du produit ou un problème au niveau de la souche (stress par rapport à une éventuelle erreur de manipulation).

### 4.1.2- 2<sup>ème</sup> expérience

Pour la deuxième expérience notre produit ATORVASTATINE 80mg a été diluée à  $10^{-2}$  g/ml à la place de  $10^{-1}$  g/ml (solution mère) qui n'a pas permis de mettre en évidence une contamination provoquée par les souches de référence (solution mère peut être trop chargé en médicament). L'expérience s'est déroulée avec l'utilisation du « TSE » comme diluant. Dans cet essai les tests ne sont pas réalisés au même temps. Il suffit qu'une seule souche ne donne pas un résultat acceptable « satisfaisant » que ce soit par rapport au paramètre du dénombrement ou bien de la recherche spécifique, cela signifie que la méthode utilisée n'est pas valide. Les résultats des tests du DGAT sont mentionnés dans le (tableau 11).

**Tableau 11:** Taux de recouvrement du dénombrement des germes aérobies totaux DGAT 2eme expérience.

DGAT	TAUX DE RECOUVREMENT					CONCLUSION
	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A. Brasiliensis</i>	
Germes						
Boite 1 (C+)	10	73	35	80	40	<b>Résultats Non satisfaisants Dilution non retenue</b>
Boite 2 (C+)	04	78	38	76	41	
Moyenne C+	07	76	37	78	41	
Boite 1 (E)	00	00	00	00	00	
Boite 2 (E)	00	00	00	00	00	
Moyenne(E)	00	00	00	00	00	
Ajustement C-E	<b>07</b>	<b>76</b>	<b>37</b>	<b>78</b>	<b>41</b>	
Boite 1 (T+)	90	88	51	107	45	
Boite 2 (T+)	78	77	42	92	39	
Moyenne T+	<b>84</b>	<b>83</b>	<b>47</b>	<b>100</b>	<b>42</b>	
<b>Recouvrement</b>	<b>0.08</b>	<b>0.91</b>	<b>0.78</b>	<b>0.78</b>	<b>0.97</b>	

C+ : le contrôle positif, E : l'essai ou Contrôle négatif, T+ : témoin positif



## Résultats et Discussions

Le taux de recouvrement pour tout les germes aérobie totaux est dans la limite d'acceptation sauf *Staphylococcus aureus* (moins de 0.5) donc le résultat est **non satisfaisant**. La supposition due à une activité antimicrobienne du médicament qui n'a pas laissé la souche à pousser ou bien la souche est stressée.

### 4.1.3- 3ème expérience

Comme la dilution testée(dans la 2ème expérience) ne donne pas un résultat satisfaisant pour le premier paramètre testé qui est le DGAT, on a passé directement à une 3<sup>ème</sup> expérience avec l'ajout d'un neutralisant de l'activité antimicrobienne du médicament (ATORVASTATINE) qui est le Tween 80 (polysorbate) à 0,5%. Les résultats du taux de recouvrement du test DGAT sont reportés dans le tableau 12.

**Tableau 12:**Tauxderecouvremenntdu DGAT3eme experience.

DGAT	TAUX DE RECOUVREMENT					CONCLUSION
	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A. Brasiliensis</i>	
Germes						
Boite 1 (C+)	30	88	58	77	52	<b>Résultats Non satisfaisants Dilution non retenue</b>
Boite 2 (C+)	23	91	51	76	59	
Moyenne C+	27	90	55	77	56	
Boite 1 (E)	00	00	00	00	00	
Boite 2 (E)	00	00	00	00	00	
Moyenne(E)	00	00	00	00	00	
Ajustement C-E	<b>25</b>	<b>90</b>	<b>55</b>	<b>77</b>	<b>56</b>	
Boite 1 (T+)	88	107	63	80	63	
Boite 2 (T+)	74	91	56	87	61	
Moyenne T+	<b>81</b>	<b>99</b>	<b>60</b>	<b>84</b>	<b>62</b>	
<b>Recouvrement</b>	<b>0.30</b>	<b>0.90</b>	<b>0.91</b>	<b>0.91</b>	<b>0.90</b>	

C+ : le contrôle positif, E : l'essai ou Contrôle négatif, T+ : témoin positif

La constatation d'une légère amélioration concernant le taux d'acceptation du paramètre de recherche qui est le DGAT, plus précisément pour la souche *Staphylococcus aureus* qui est passé de 0,08 à 0,30 (un effet positif du neutralisant sur le rendement de l'expérience).

## Résultats et Discussions

### 4.1.4- 4<sup>ème</sup> expérience

Suivant les résultats des trois expériences effectuées, une quatrième expérience a été faite en augmentant la concentration du neutralisant à 1% Tween 80 avec le maintien de la dilution des deux dernières expériences ( $10^{-2}$  g/ml). Les résultats de l'expérience quatre sont mentionnés dans le (tableau 13).

**Tableau 13** : Taux de recouvrement du DGAT 4eme expérience.

DGAT	TAUX DE RECOUVREMENT					CONCLUSION
	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A. Brasiliensis</i>	
Germes						
Boite 1 (C+)	60	94	94	99	56	<b>Résultats satisfaisants Dilution retenue</b>
Boite 2 (C+)	83	55	98	87	57	
Moyenne C+	72	75	96	93	57	
Boite 1 (E)	00	00	00	00	00	
Boite 2 (E)	00	00	00	00	00	
Moyenne (E)	00	00	00	00	00	
Ajustement C-E	<b>72</b>	<b>75</b>	<b>96</b>	<b>93</b>	<b>57</b>	
Boite 1 (T+)	59	94	59	89	47	
Boite 2 (T+)	57	80	73	103	77	
Moyenne T+	<b>58</b>	<b>87</b>	<b>66</b>	<b>96</b>	<b>62</b>	
<b>Recouvrement</b>	<b>1.24</b>	<b>0.86</b>	<b>1.45</b>	<b>0.96</b>	<b>0.91</b>	

C+ : le contrôle positif, E : l'essai ou Contrôle négatif, T+ : témoin positif

La dilution testée  $10^{-2}$  avec TSE+1% tween 80 donne un résultat satisfaisant, la dilution est donc retenue ainsi que le pourcentage du tween 80.

Le diluant TSE avec l'ajout de 1%de Tween 80 qui est un neutralisant standard a pu neutraliser l'activité antimicrobienne du produit et donc l'apparition de toutes les souches microbiennes incluant *Staphylococcus aureus*.

Puisque le résultat est satisfaisant pour le DGAT donc il sera surement aussi satisfaisant pour DMLT ce qui signifie que cette méthode de validation microbiologique est bonne. Dans ce cas, le lancement de validation microbiologique des 3 lots d'ATORVASTATINE 80mg par la suite est nécessaire.



### 4.2- La validation microbiologique des différents lots

Vu l'amélioration considérable des résultats par rapport à la souche *Staphylococcus aureus* dans la quatrième expérience il a été décidé alors de lancer l'ensemble des paramètres de recherche (DGAT, DMLT et les recherches spécifique) pour le premier lot de l'ATORVASTATINE 80mg à valider.

Les lots vont être lancés avec la méthode analytique obtenue dans la quatrième expérience avec l'utilisation d'un diluant « TSE + 1% Tween (polysorbate) », et la dilution de l'échantillon testé  $10^{-2}$ g/ml.

#### 4.2.1- 1er lot 8224

Les résultats de calcul du taux de recouvrement obtenus pour les paramètres du dénombrement DGAT et DMLT sont mentionnés dans les (Tableaux 14 et 15 respectivement).

**Tableau 14** : Taux de recouvrement du DGAT du lot 8224.

DGAT	TAUX DE RECOUVREMENT					CONCLUSION
	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A. Brasiliensis</i>	
Germes						<b>Résultats satisfaisants Dilution retenue</b>
Boite 1 (C+)	60	94	94	99	56	
Boite 2 (C+)	83	55	98	87	57	
Moyenne C+	72	75	96	93	57	
Boite 1 (E)	00	00	00	00	00	
Boite 2 (E)	00	00	00	00	00	
Moyenne (E)	00	00	00	00	00	
Ajustement C-E	<b>72</b>	<b>75</b>	<b>96</b>	<b>93</b>	<b>57</b>	
Boite 1 (T+)	59	94	59	89	47	
Boite 2 (T+)	57	80	73	103	77	
Moyenne T+	<b>58</b>	<b>87</b>	<b>66</b>	<b>96</b>	<b>62</b>	
<b>Recouvrement</b>	<b>1.24</b>	<b>0.86</b>	<b>1.45</b>	<b>0.96</b>	<b>0.91</b>	

C+ : le contrôle positif, E : l'essai ou Contrôle négatif, T+ : témoin positif

La dilution testée  $10^{-2}$  avec TSE+1%tween 80 donne un résultat satisfaisant avec toutes les souches du DGAT (Taux de recouvrement respecte les critères d'acceptation), la dilution est donc retenue pour la suite des analyses.

## Résultats et Discussions

Dans ce test, la limite de détection soit à 100 UFC/g (calibrage effectuer avec 0,01 ml de contaminant pour arriver à 100 UFC/g) et la spécification après calcul du taux de recouvrement est respecté (Spécification  $\leq 10^3$  UFC/g).

De même, en ce qui concerne DMLT, La dilution testée  $10^{-2}$  avec TSE+1% tween 80 donne un résultat satisfaisant avec toutes les souches du DMLT (Taux de recouvrement respecte les critères d'acceptation). La dilution est donc retenue pour la suite des analyses. Cette dilution testée donne un résultat satisfaisant pour DMLT, avec 100UFC/g comme limite de détection et spécification respectée après calcul du taux de recouvrement  $\leq 10^2$  UFC/g.

**Tableau 15** : Taux de recouvrement du DMLT du lot 8224.

DMLT	TAUX DE RECOUVREMENT		CONCLUSION
	<i>C.albicans</i>	<i>A. Brasiliensis</i>	
Germes			
Boite 1 (C+)	93	56	<b>Résultats Satisfaisants Dilution retenue</b>
Boite 2 (C+)	99	58	
Moyenne C+	96	57	
Boite 1 (E)	00	00	
Boite 2 (E)	00	00	
Moyenne (E)	00	00	
Ajustement C-E	<b>96</b>	<b>57</b>	
Boite 1 (T+)	89	47	
Boite 2 (T+)	103	77	
Moyenne T+	<b>96</b>	<b>62</b>	
<b>Recouvrement</b>	<b>1.00</b>	<b>0.91</b>	

C+ : le contrôle positif, E : l'essai ou Contrôle négatif, T+ : témoin positif

- **Recherche spécifique**

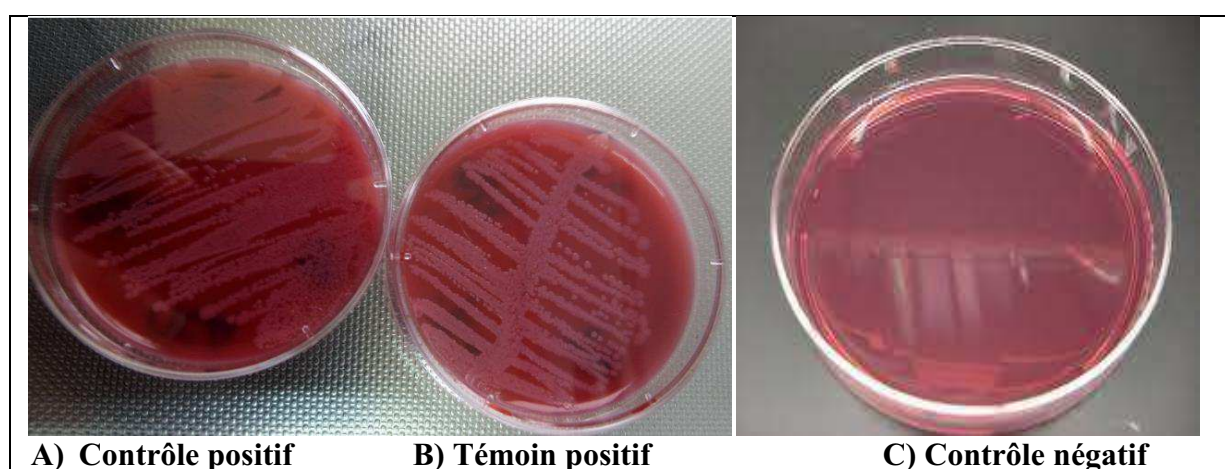
Dans la première expérience le résultat était non satisfaisant car la souche *Staphylococcus aureus* n'a pas apparu dans le Contrôle positif en utilisant la solution mère et le diluant TSE sans rajout de neutralisant. Le lancement des lots a commencé dès que les souches du paramètres DGAT sont apparus dans la quatrième expérience donc la recherche spécifique se fait selon la méthode de cette dernière en utilisant le diluant TSE+1% Tween 80.

## Résultats et Discussions

- **Recherche de *Escherichia coli***

Avec l'utilisation de la première dilution du produit ( $10^{-1}$ g/ml) et diluant TSE+1%Tween 80, La recherche de *Escherichia coli* est valide en respectant la spécification imposé par la pharmacopée européenne (« Absence/g absence du contaminant dans le contrôle négatif » et « présence/g du contaminant dans le contrôle et témoin positif »).

La limite de détection est l'identification macroscopique du contrôle positif et témoin positif « présence/g » qui montre une pigmentation rose, fait référence au développement de la souche *Escherichia coli* sur le milieu Macconkey agar. Le contrôle négatif confirme la spécification Absence/g traduite par l'absence du développement de la souche (Figure 12).



**Figure 12** :Recherche spécifique de *Escherichia coli* «A :Contrôle positif, B :Témoin positif, C :Contrôle négatif ».

La dilution de la solution mère donne un résultat satisfaisant, limite de détection présence/g (contrôle positif et témoin positif) (Tableau 16) et spécification respectée absence/g (absence de contamination par rapport à l'essai « contrôle négatif »).

**Tableau 16** : Recherche d'*E.coli* pour le lot 8224.

<b>Recherche <i>E.coli</i> :</b>	<b>Résultats : Croissance des colonies sur MCA de couleur rouge brique</b>		<b>Conclusion</b>
Tests	Témoin positif (T+)	Contrôle positif (C+)	
TSB + dilution $10^{-1}$ g/ml	Culture positive	Culture positive	Satisfaisant

Culture positive = présence de la souche.

## Résultats et Discussions

- **Recherche de *Staphylococcus aureus***

Avec l'utilisation de la première dilution du produit ( $10^{-1}$ g/ml) et diluant TSE+1%Tween 80, la recherche de *Staphylococcus aureus* est valide en respectant la spécification imposé par la pharmacopée européenne (« Absence/g absence du contaminant dans le contrôle négatif » et « présence/g du contaminant dans le contrôle et témoin positif »).

La dilution testée donne une culture positif (présence de la culture pour le (T+) ) et résultat négatif (absence de la culture pour le (C+)), ce qui fait que le résultat de la recherche spécifique pour *Staphylococcus aureus* est non satisfaisant (Tableau 17).

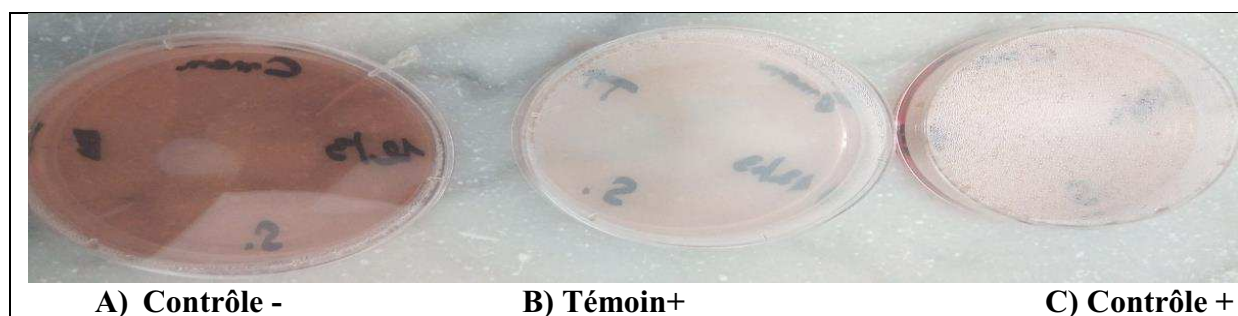
**Tableau 17** : Recherche de *S.aureus* du 1er lot 8224.

Recherche <i>S. aureus</i> :	Résultats : Croissance des colonies		Conclusion
	Tests	Témoin positif (T+)	
TSB + dilution $10^{-1}$ g/ml	Culture positive	Culture négative	Non satisfaisant

Culture positive = présence de la souche ; Culture négative = absence de la souche.

Vu que le résultat obtenu par la solution mère en diluant TSE+1% Tween 80 n'est pas satisfaisant, le rajout de 1% Tween 80 au milieu d'enrichissement « TSB » est nécessaire. Car l'ajout de la Tween80 au TSE peut rendre ce dernier toxique vis-à-vis la souche.

Après l'ajout de 1% Tween 80+TSB (inhibition de l'activité antimicrobienne), le résultat est satisfaisant avec une limite de détection présence/g (contrôle positif et témoin positif) et spécification absence/g (contrôle négatif) (tableau 18). Les cultures se développent dès 24h en amas réguliers arrondis de couleur blanche, identifié par la fermentation du mannitol qui est mis en évidence par le virage au jaune de l'indicateur pH (Figure13).



**Figure 13** : Recherche spécifique pour la souche *Staphylococcus aureus* « A :Contrôle -, B : Témoin +, C : Contrôle + ».



## Résultats et Discussions

**Tableau 18 :** Recherche *S.aureus* du lot 8224 après modification des paramètres (TSB+1% Tween 80).

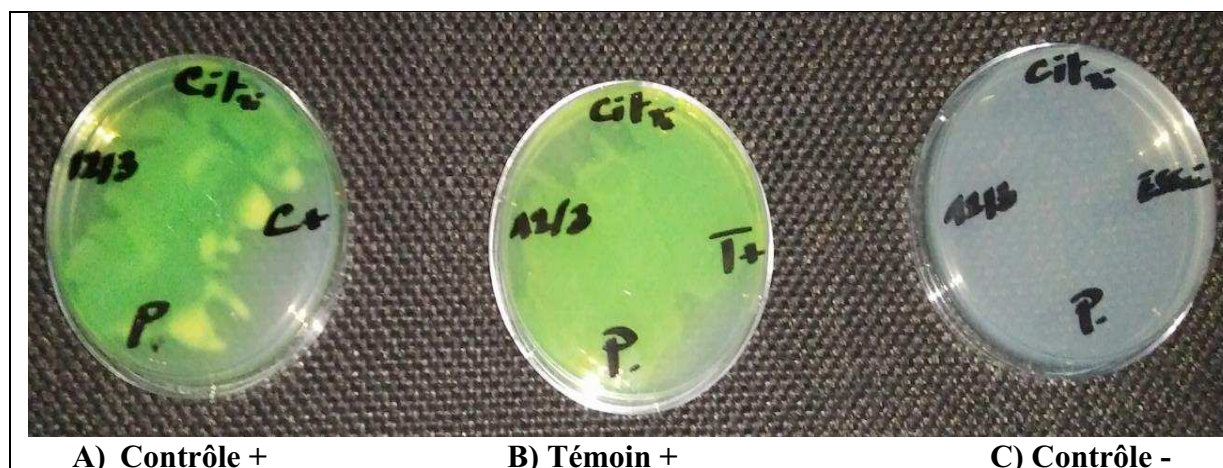
Recherche <i>S. aureus</i> :	Résultats : Croissance des colonies		Conclusion
	Tests	Témoin positif	
TSB+1%Tween + Dilution 10 <sup>-1</sup> g/ml	Culture positive	Culture positive	Satisfaisant

Culture positive = présence de la souche

- **Recherche de *Pseudomonas aeruginosa***

Toujours avec l'utilisation de la première dilution du produit (10<sup>-1</sup>g/ml) et diluant TSE+1%Tween 80, la recherche de *Pseudomonas aeruginosa* est valide en respectant la spécification imposé par la pharmacopée européenne (Absence/g « absence du contaminant dans le contrôle négatif »).

La limite de détection est l'identification macroscopique du contrôle positif et témoin positif « présence/g » par des colonies avec de pigmentations bleu ou bleu-vert et une fluorescence sous ultraviolets à 254 nm sur le milieu Cétrimide. La spécification est respectée avec l'absence de culture des souches sur la boîte du contrôle négatif (Figure 14).



**Figure 14 :** Recherche spécifique pour la souche *Pseudomonas aeruginosa* « A : Contrôle +, B : Témoin +, C : Contrôle – ».

La recherche est donc valide avec dilution de la solution mère TSE+1%tween80, limite de détection présence/g (Contrôle positif et témoin positif) (Tableau 19). Et spécification respectée absence/g (absence de contamination par rapport à l'essai « contrôle négatif »).

## Résultats et Discussions

**Tableau 19:**Résultat *P.aeruginosa* lot 8224.

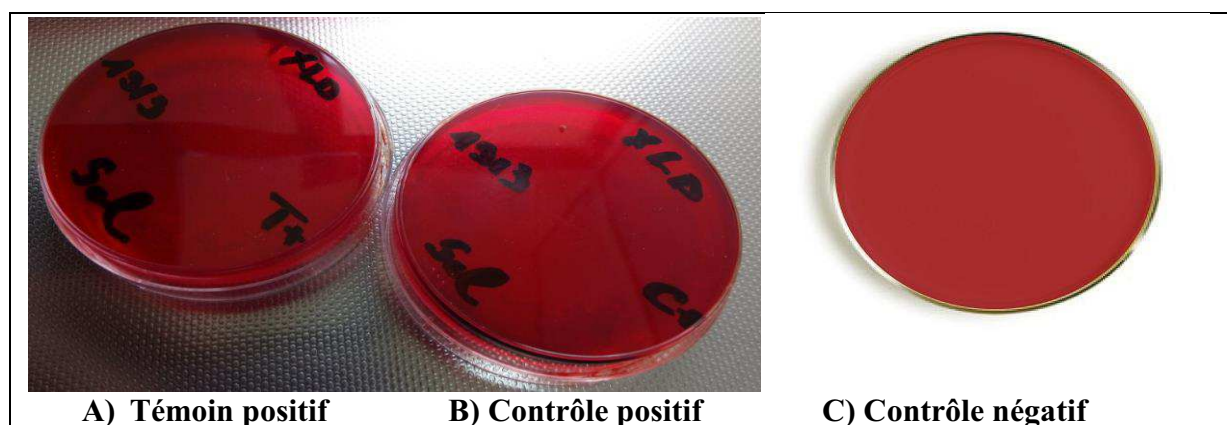
Recherche	Résultats : Croissance des colonies		Conclusion
<i>P. aeruginosa</i> :			
Tests	Témoin positif	Contrôle positif	
TSB + dilution 10 <sup>-1</sup> g/ml	Culture positive	Culture positive	Satisfaisant

Culture positive = présence de la souche.

- **Recherche de *Salmonella***

La recherche de ce germe est effectuée par l'absence de culture ou présence par 10 grammes de médicament. Pour se faire, dissoudre 9 comprimés d'ATORVASTATINE dans le TSB « TSB Considéré comme milieu d'enrichissement et diluant pour la recherche de *Salmonella* ».

D'après les résultats montrés dans (figure 15), un développement de Bacille de couleur rose « limite de détection présence/10g » avec sécrétion de toxine traduite par un halo noir autour de la boîte de Pétri (pour les tests contrôle positif et témoin positif) a été remarqué. Alors que, la boîte de Pétri du contrôle négatif présente une absence d'un développement de *Salmonella* « spécification Absence/10g ».



**Figure 15 :** Repiquage de recherche spécifique de la *Salmonella* « A : Témoin +, B : Contrôle +, C : Contrôle négatif ».

La dilution testée donne un résultat satisfaisant, limite de détection respectée présence/10g (T+ et C+)(Tableau 20). Et spécification : absence/10g (contrôle négatif).



## Résultats et Discussions

**Tableau 20** : Recherche de *Salmonella* du lot 8224.

Recherche <i>Salmonella</i>	Résultats : Croissance des colonies		Conclusion
	Tests		
	Témoin positif (T+)	Contrôle positif(C+)	
Solution TSB	Culture positive	Culture positive	Satisfaisant

Culture positive = présence de la souche

- **Remarque :**

Afin de respecter la fidélité et la répétabilité des résultats, les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> lots sont lancés avec les mêmes paramètres du 1<sup>er</sup> lot, dont :

-Les DGAT et DMLT : se réalisent avec la dilution  $10^{-2}$ g/ml et le diluant TSE+1%tween 80.

- La recherche spécifique de *P. aeruginosa*, *S.aureus* et *E.coli*: se réalise avec le Diluant TSE+1%tween 80 et le milieu d'enrichissement TSB .Par contre la recherche de *Salmonella* se réalise avec le Diluant TSB.

### 4.2.2- 2ème lot 8225

- **DGAT et DMLT**

-Les résultats mentionnés dans les tableaux 21 et 22 (pour DGAT et DMLT, respectivement), sont satisfaisants. Les taux de recouvrements sont dans la limite d'acceptation pour toutes les souches (Limites de détection : 100 UFC/g avec Spécification  $\leq 10^3$  UFC/g et  $\leq 10^2$  UFC/g pour DGAT et DMLT, respectivement).Donc la dilution  $10^{-2}$  avec TSE+1%tween 80 est retenue. Le diluant TSE avec 1%tween 80(neutralisant standard) a pu neutraliser l'activité antimicrobienne du produit.

## Résultats et Discussions

**Tableau 21:** DGAT du 2eme lot 8225.

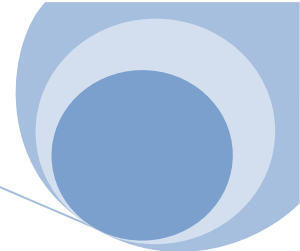
DGAT	TAUX DE RECOUVREMENT					CONCLUSION
	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A. Brasiliensis</i>	
Germes						Résultats satisfaisants Dilution retenue
Boite 1 (C+)	78	66	51	88	44	
Boite 2 (C+)	91	68	41	97	41	
Moyenne C+	85	67	46	93	57	
Boite 1 (E)	00	00	00	00	00	
Boite 2 (E)	00	00	00	00	00	
Moyenne(E)	00	00	00	00	00	
Ajustement C-E	<b>85</b>	<b>67</b>	<b>46</b>	<b>93</b>	<b>43</b>	
Boite 1 (T+)	72	71	43	107	51	
Boite 2 (T+)	82	69	40	91	56	
Moyenne T+	<b>77</b>	<b>78</b>	<b>42</b>	<b>99</b>	<b>54</b>	
<b>Recouvrement</b>	<b>1.10</b>	<b>0.85</b>	<b>1.09</b>	<b>0.93</b>	<b>0.79</b>	

C+ : le contrôle positif, E : l'essai ou Contrôle négatif, T+ : témoin positif

**Tableau 22 :** DMLT du lot 8225.

DMLT	TAUX DE RECOUVREMENT		CONCLUSION
	<i>C.albicans</i>	<i>A. Brasiliensis</i>	
Germes			Résultats Satisfaisants Dilution retenue
Boite 1 (C+)	80	40	
Boite 2 (C+)	81	33	
Moyenne C+	81	37	
Boite 1 (E)	00	00	
Boite 2 (E)	00	00	
Moyenne(E)	00	00	
Ajustement C-E	<b>81</b>	<b>37</b>	
Boite 1 (T+)	83	48	
Boite 2 (T+)	88	41	
Moyenne T+	<b>86</b>	<b>45</b>	
<b>Recouvrement</b>	<b>0.94</b>	<b>0.82</b>	

C+ : le contrôle positif, E : l'essai ou Contrôle négatif, T+ : témoin positif



- **Recherche Spécifique**

Les Souches *S.aureus*, *P.aeruginosa* et *E.coli* présentent des résultats satisfaisants, avec une limite de détection « présence/g pour les contrôles positif et témoins positif » et spécification respecté « Absence/g pour les contrôles négatif ». De même, La souche *Salmonella* présente un résultat satisfaisant « Présence/10g, contrôle positif et témoin positif » et spécification respecté « Absence/10g, contrôle négatif » Tableau 23.

**Tableau 23** : Recherche spécifique des souches lot 8225.

<b>Souche</b>	<b><i>S.aureus</i></b>	<b><i>P.aeruginosa</i></b>	<b><i>E.coli</i></b>	<b><i>Salmonella</i></b>
<b>Lot 8225</b>	<b>Satisfaisant</b>	<b>Satisfaisant</b>	<b>Satisfaisant</b>	<b>Satisfaisant</b>

**Satisfaisant** : limite détection présence/g et spécification Absence/g.

### 4.2.3- 3ème lot 8226

- **DGAT et DMLT**

-Résultats satisfaisants pour les deux tests des DGAT et DMLT: le taux de recouvrement est dans la limite d'acceptation pour toutes les souches (Limites de détection : 100 UFC/g avec Spécification  $\leq 10^3$  UFC/g et  $\leq 10^2$  UFC/g pour DGAT et DMLT respectivement). Donc, la dilution  $10^{-2}$  avec TSE+1% tween 80 est de même retenue (Tableaux 24 et 25).

Le diluant TSE avec l'ajout de 1% tween 80 qui est un neutralisant standard a pu neutraliser l'activité antimicrobienne du produit et donc l'apparition de toutes les souches microbiennes.

## Résultats et Discussions

**Tableau 24:** Résultats DGAT lot 8226.

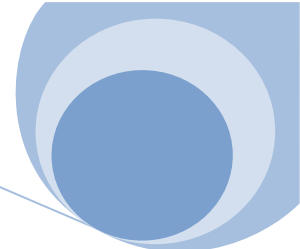
DGAT	TAUX DE RECOUVREMENT					CONCLUSION
	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A. Brasiliensis</i>	
Germes						Résultats satisfaisants Dilution retenue
Boite 1 (C+)	74	70	40	80	49	
Boite 2 (C+)	83	73	38	93	43	
Moyenne C+	79	72	39	87	46	
Boite 1 (E)	00	00	00	00	00	
Boite 2 (E)	00	00	00	00	00	
Moyenne(E)	00	00	00	00	00	
Ajustement C-E	<b>79</b>	<b>72</b>	<b>39</b>	<b>87</b>	<b>46</b>	
Boite 1 (T+)	72	71	43	107	51	
Boite 2 (T+)	82	69	40	91	56	
Moyenne T+	<b>77</b>	<b>78</b>	<b>42</b>	<b>99</b>	<b>54</b>	
<b>Recouvrement</b>	<b>1.02</b>	<b>0.92</b>	<b>0.92</b>	<b>0.87</b>	<b>0.85</b>	

C+ : le contrôle positif, E : l'essai ou Contrôle négatif, T+ : témoin positif

**Tableau 25 :** Résultats DMLT lot 8226.

DMLT	TAUX DE RECOUVREMENT		CONCLUSION
	<i>C.albicans</i>	<i>A. Brasiliensis</i>	
Germes			Résultats Satisfaisants Dilution retenue
Boite 1 (C+)	90	41	
Boite 2 (C+)	79	37	
Moyenne C+	85	39	
Boite 1 (E)	00	00	
Boite 2 (E)	00	00	
Moyenne(E)	00	00	
Ajustement C-E	<b>85</b>	<b>39</b>	
Boite 1 (T+)	83	48	
Boite 2 (T+)	88	41	
Moyenne T+	<b>86</b>	<b>45</b>	
<b>Recouvrement</b>	<b>0.98</b>	<b>0.86</b>	

C+ : le contrôle positif, E : l'essai ou Contrôle négatif, T+ : témoin positif



- **Recherche spécifique**

Les Souches *S.aureus*, *P.aeruginosa* et *E.coli* présentent des résultats satisfaisants avec une limite de détection « présence/g pour les contrôles positif et témoins positif » et spécification respectée « Absence/g pour les contrôles négatif ». La souche *Salmonella* présente un résultat satisfaisant « Présence/10g, contrôle positif et témoin positif » et spécification respectée « Absence/10g, contrôle négatif » (Tableau 26).

**Tableau 26** : Recherche spécifique des souches lot 8226.

Souche	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>
Lot 8226	Satisfaisant	Satisfaisant	Satisfaisant	Satisfaisant

**Satisfaisant** : limite détection présence/g et spécification Absence/g.

### 4.3- Protocole final de la validation microbiologique (récapitulatif)

ATORVASTATINE LDM® 80 mg a été traité selon les recommandations de la Pharmacopée Européenne 9.2<sup>ème</sup> édition, Chapitre 2.6.12 et 2.6.13 et le dossier technique.

❖ **Pour le dénombrement des germes aérobies totaux(DGAT) et le dénombrement des levures et moisissures totales(DMLT)** : la dilution de médicament au 10<sup>-2</sup>g/ml avec le diluant TSE(solution tampon peptonée au Chlorure de sodium (pH=7))plus 1% tween80 ont permis de mettre en évidence une contamination provoqué du produit par les souches de références. Cette dilution est donc retenue.

❖ **Pour la recherche des germes spécifiés :**

✓ **Pour *E.coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*** : la Solution mère 10<sup>-1</sup>g/ml avec le diluant TSE (Solution tampon peptonée au Chlorure de sodium (pH=7) )plus 1% tween80 et le TSB comme bouillon d'enrichissement ont permis de mettre en évidence une contamination du produit provoquées par les souches citées. La Solution mère est donc retenue comme celle compatible avec les spécifications du produit.

✓ **Pour *Salmonella*** : le bouillon TSB a permis de mettre en évidence une contamination du produit par *Salmonella*. La Solution est donc retenue comme celle compatible avec les spécifications du produit.

# **Conclusion**

### 5- Conclusion

Le contrôle de qualité des produits pharmaceutiques est réalisé en Algérie dans les laboratoires pharmaceutiques. LNCPP « laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques » exige la validation d'une méthode d'analyse microbiologique des produits pharmaceutiques à commercialiser sur le marché, pour s'assurer leur bonne qualité.

La validation d'une méthode analytique est aujourd'hui considérée comme une démarche essentielle qui apporte à l'utilisateur la confiance nécessaire dans les résultats obtenus lors de sa mise en œuvre. Cependant, la réalisation concrète de la validation des méthodes n'est pas toujours aisée. En effet, bien qu'il existe de nombreux textes réglementaires définissant les paramètres de validation, il est difficile d'obtenir des exemples pratiques de protocoles expérimentaux.

Cette difficulté est encore bien plus présente lorsqu'il s'agit de la validation des méthodes d'analyses microbiologiques. En effet, les différents guides édités par les organismes réglementaires sont plus particulièrement adaptés aux méthodes d'analyses physico-chimiques et certains critères de validation sont difficilement transposables aux méthodes microbiologiques.

Dans ce contexte, nous avons fait une étude réalisée en deux mois au sein du laboratoire pharmaceutique LDM, et qui nous a fourni tout le nécessaire afin de réaliser le présent travail où nous nous sommes intéressés à la validation d'une méthode d'analyse microbiologique. D'ailleurs, nous avons étudié le cas du médicament « ATORVASTATINE 80mg ».

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 au niveau de laboratoire et la troisième était la réalisation de différentes expériences et essais de la validation.

Bien que la méthode a été validée pour **DGAT « dénombrement des germes aérobies mésophile totaux »** et **DMLT « dénombrement des moisissures et levures totaux »** avec le choix de la dilution précise  $10^{-2}$ g/ml et le diluant TSE+1%Tween. Aussi **la Recherche spécifique** par le choix de la dilution précise du médicament  $10^{-1}$ g/ml et le diluant adéquat « TSB pour *Salmonella* » et « TSE+1%Tween pour les souches *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* », en respectant la limite de détection et

## Conclusion

la spécification du nombre UFC précis, afin d'établir un protocole final pour l'analyse microbiologique de routine.

Ainsi, il faut s'assurer que les résultats ne dérivent pas, pour cela un moyen efficace est mis en place qui est la répétabilité d'essais dans le même laboratoire et dans les mêmes conditions (sur trois lots) du même médicament et avec les mêmes manipulateurs. Il peut être nécessaire que la validation d'une méthode microbiologique fait l'objet d'une reproductibilité si le laboratoire participe à des essais inter-laboratoire pour confirmer ces résultats.



# **Références**

# **Bibliographiques**

## 6-Références Bibliographiques

### A :

**Aiache, J.M ., Beyssac, E., Cardot, J.M., Hoffart, V. et Renoux, R.** Initiation a la connaissance du médicament. Masson 5<sup>ème</sup> (2008) p : 413

**Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé .,** Les médicaments génériques des médicaments a part entière (2012) p : 5

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

### B:

**Baumgartner ;** Guide pour la validation de méthodes d'essais microbiologiques et l'évaluation de leur incertitude de mesure dans les domaines de la microbiologie alimentaire et de l'environnement (2017).

**Biologiemarine., (2003):** <http://www.biologiemarine.com/micro/milcult.htm>

**biokar-diagnostics.,** Milieu de culture(2009) [www.biokar-diagnostics.fr](http://www.biokar-diagnostics.fr).

### C :

**C.Renaud .,** Validation des méthodes analytiques, application a la méthode de la bio charge .(2016) P :1 .

### D:

**Ducellier P .,** Validation de méthodes analytiques « maison », dans la revue du technicien de laboratoire médical, Tech labo (2013) n°2.P : 10

### E :

**Ernoul R.,** Le grand livre de la qualité : management par la qualité dans l'industrie, une affaire de méthodes édition afnor (2013) p : 17-23.

### F :

**FEINBERG. Max.,** LABO-STAT - Guide de validation des méthodes d'analyse, Edition Lavoisier Tec & Doc. (2009) P : 10,13

**Fernando Albericio.,** De la conception du médicament a son développement (2010) p : 77

## **G :**

**Gouraud A.**, Généralité sur la pharmacologie et les médicaments (partie1). EditionIFSI Rockefeller. (2012) P : 8.

## **H:**

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

**Hallouet P.**, Méga Mémo IFSI. 2<sup>ème</sup> édition. (2016) p : 396.

## **I :**

**ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE.**, Evaluation and recommendation of pharmacopoeial texts for use in the ICH regions (2010)  
p:1

## **L:**

**Le Laborantin.**, matériel laboratoire (2017) [www.laborantin.com/agitateur-vortex-a-vitesse-reglable-701441.html](http://www.laborantin.com/agitateur-vortex-a-vitesse-reglable-701441.html).

## **M :**

**M.FERDERIN.**, UNE AIDE A LA DÉMARCHE DE VALIDATION DES METHODES ANALYTIQUES(2017). P : 1

**Management sciences for health and world health organization**, managing drug supply. (1997) p: 182

**M. Raynaud.**, VALIDATION DU PROCEDE DE FABRICATION DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE, APPLIQUEE AUX FORMES SOLIDES ORALES (2011). p : 37, 38,39

## **N :**

**Norme ISO 17025**, Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

## **O :**

**Organisation mondiale de la santé** ; marché des médicaments à usage humain notamment d'origine multi source génériques. (OMS, 2008) p : 55

## **P :**

**P. Errard.**, « Bilan économique des Entreprises du Médicament ». Ed. LEEM - Les entreprises du médicament, Paris, [www.leem.org](http://www.leem.org), (01-sept-2016).

**Pharmacopée européenne 9.2**, guide technique paramètres de validation (chapitre 5.1.4, chapitre 2.6.12, chapitre 2.6.13).

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

**U :**

**U.S. Food and Drug Administration.**, Guidance for Industry Sterile Drug Products (2004)p: 29

**W:**

**WHO.**, Good manufacturing practices for pharmaceutical products: main principles, technical report series (2011) n°961.

**Willya S.**, Le manager, la qualité et les normes ISO, Edition Masson, Paris, (1996) pp : 148

# Résumés

## 7- Résumé

Dans notre étude, nous avons mis en œuvre les nouvelles exigences de la version 9.2 de la Pharmacopée européenne, qui assurent la validation de l'analyse microbiologique d'un médicament (ATORVASTATINE 80mg). Ce dernier est fabriqué au niveau du laboratoire de diagnostic maghrébin (LDM). L'objectif est d'obtenir un produit pharmaceutique de bonne qualité et de veiller à ce que les patients soient guéris et satisfaits.

La validation est appliquée par la contamination artificielle du produit par une variété de microorganismes bien définis. La première partie de cette étude nous a permis d'aborder les normes de l'industrie pharmaceutique et l'impact du contrôle de qualité microbiologique sur la qualité.

Après avoir défini les critères et les méthodes d'analyse, nous avons immédiatement abordé la validation microbiologique d'ATORVASTATINE 80 mg par des méthodes quantitatives DGAT « dénombrement des germes aérobies totaux » et DMLT « dénombrement des moisissures et levures totales » aussi qualitatives par la recherche spécifique des germes comme *Salmonella*, *E.coli*, *S.aureus* et *P.aeruginosa*. Ces paramètres qui ont été vérifiés à trois reprises (par l'utilisation de 3 lots différents 8224,8225,8226), nous a permis d'établir un protocole de contrôle microbiologique de routine de ce médicament par la sélection de la dilution et le diluant adéquats.

De ce fait, la validation par les DGAT et DMLT a été fixée dans le protocole final avec la dilution  $10^{-2}$ g/ml de médicament et le diluant TSE (Tryptone sel – Bouillon )+1%Tween 80 .De plus, la recherche spécifique est assurée par le choix de la dilution  $10^{-1}$ g/ml et le diluant adéquat pour chaque type de germes utilisés «TSB : Bouillon Tryptone Soja pour *Salmonella* et TSE+ 1%Tween 80 pour le reste des souches».

**Mots clés :** Validation, ATORVASTATINE 80mg, Analyses microbiologiques, DGAT, DMLT, Recherche spécifique, Pharmacopée européenne.

## Abstract :

In our study, we implemented the new requirements of version 9.2 of the European Pharmacopoeia, which validates the microbiological analysis of a drug (ATORVASTATIN 80mg) .The latter is manufactured at the level of the Maghrebian diagnostic laboratory (MDL). The goal is to obtain a good quality pharmaceutical product and to ensure that patients are cured and satisfied.

Validation is applied by artificial contamination of the product by a variety of well-defined microorganisms. The first part of this study allowed us to address the standards of the pharmaceutical industry and the impact of microbiological quality control on quality.

After defining the criteria and the methods of analysis, we immediately approached the microbiological validation of ATORVASTATIN 80 mg by quantitative methods DGAT "enumeration of the total aerobic germs" and DMLT "enumeration of the molds and total yeasts" as qualitative by the Specific search for germs such as *Salmonella*, *E. coli*, *S.aureus* and *P. aeruginosa*. These parameters were verified three times (by the use of 3 different batches 8224,8225,8226), allowed us to establish a protocol for routine microbiological control of this drug by selection of dilution and diluent adequate.

Therefore, validation by the DGAT and DMLT was fixed in the final protocol with the dilution of 10-2g / ml drug and diluent TSE (Tryptone salt - broth) + 1% Tween 80. In addition, the specific research is ensured by the choice of the 10<sup>-1</sup>g / ml dilution and the appropriate diluent for each type of germ used "TSB: Tryptone Soy Broth for *Salmonella* and TSE + 1% Tween 80 for the rest of the strains".

Key words: Validation, ATORVASTATIN 80mg, Microbiological analyzes, DGAT, DMLT, Specific research, European Pharmacopoeia.

## ملخص

في دراستنا ، قمنا بتنفيذ المتطلبات الجديدة من الإصدار 9.2 من دستور الأدوية الأوروبي ، والتي تهدف الى التحقق من صحة التحليل الميكروبيولوجي للدواء (ATORVASTATIN 80mg). يتم تصنيع هذا الأخير على مستوى المختبر التشخيصي المغربي (LDM). الهدف من ذلك هو الحصول على منتج صيدلاني جيد النوعية وضمان علاج المرضى ورضاهم.

يتم تطبيق التحقق من الصحة عن طريق التلوث الاصطناعي للمنتج عن طريق مجموعة متنوعة من الكائنات الدقيقة المحددة جيداً. سمح لنا الجزء الأول من هذه الدراسة بمعالجة معايير صناعة الأدوية وتأثير مراقبة الجودة الميكروبيولوجية على النوعية.

بعد تحديد معايير وطرق التحليل ، تطرقنا على الفور الى التحقق من الصحة الميكروبيولوجية ATORVASTATIN 80 ملغ عن طريق الأساليب الكمية DGAT "تعداد مجموع الجراثيم الهوائية" و DMLT "تعداد الفطر والخمائر الكلية" و حسب الاساليب النوعية التي تعتبر بحث محدد عن الجراثيم مثل *Salmonella* ، *E. coli* ، *S.aureus* و *P. aeruginosa*. يتم التحقق من هذه المعلمات ثلاث مرات (عن طريق استخدام 3 دفعات مختلفة 8224 ، 8225, 8226) ، هذا ما سمح لنا بإنشاء بروتوكول للتحكم الميكروبيولوجي الروتيني لهذا الدواء عن طريق اختيار التخفيف والمخفف المناسبين.

لذلك ، تم تثبيت التحقق من صحة المعايير DGAT و DMLT في البروتوكول النهائي مع التخفيف من  $10^{-2}$  g / مل ومخفف TSE + 1 % توين 80. بالإضافة إلى ذلك ، فإن البحث المحدد يتم عن طريق التخفيف من  $10^{-1}$  g / مل والمخفف المناسب لكل نوع من البكتيريا المستخدمة "TSB لل *Salmonella* " و Tween 80 1% TSE لبقية السلالات".

الكلمات الرئيسية: التحقق من الصحة ، ATORVASTATIN 80mg ، التحليلات الميكروبيولوجية ، DGAT ، DMLT ، بحث معين ، دستور الأدوية الأوروبي.

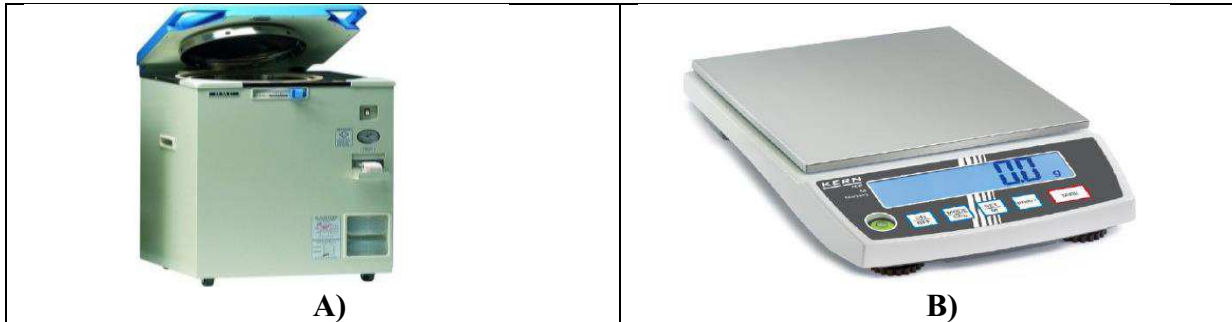


# **Annexes**

## 8-Annexes

### Annexe 1 : Matériels et appareillages utilisés

- **Salle de préparation** : équipements de la salle de préparation microbiologique (A : Autoclave, B : Balance).



- **Salle de manipulation** : équipements de la salle de manipulation (A : bain marie, B : vortex).



- **Salle d'incubation** : équipements de la salle d'incubation (A : étuve, B : compteur de colonies).



## **Annexe 2: Pharmacopée européenne 9.2<sup>ème</sup> édition., Milieux de cultures (ordinaire).**

### **- Solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0 (TSE) :**

Phosphate monopotassique	3,6g
Phosphate diodiquedihydraté 7,2g équivalent à 0,067M de phosphate	
Chlorure de sodium	4,3g
Peptone de viande de caséine	1,0g
Eau purifiée	1000mL
Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.	

### **- Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja (TSB) :**

Peptone pancréatique de caséine	17,0g
Peptone papaïque de soja	3,0g
Chlorure de sodium	5,0g
Phosphate dipotassique	2,5g
Glucose monohydrate	2,5g
Eau purifiée	1000mL
Ajuster le pH pour qu'il soit de $7,3 \pm 0,2$ à 25 °C après stérilisation. Stériliser à l'autoclave selon un cycle validé.	

### **- Milieu liquide aux peptones de caséine et de soja (TSA) :**

Peptone pancréatique de caséine	15,0g
Peptone papaïque de soja	5,0g
Chlorure de sodium	5,0g
Gélose	15,0g
Eau purifiée	1000mL
Ajuster le pH pour qu'il soit de $7,3 \pm 0,2$ à 25 °C après stérilisation. Stériliser à l'autoclave selon un cycle validé.	

### **- Milieu Sabouraud dextrosé- gélosé (SDA) :**

Dextrose	40,0g
Mélange de peptone peptique de tissu animal et de peptone pancréatique de caséine (1 :1)	10,0g
Gélose	15,0g
Eau purifiée	1000mL
Ajuster le pH pour qu'in soit de $5,6 \pm 0,2$ à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclaveselon un cycle validé.	


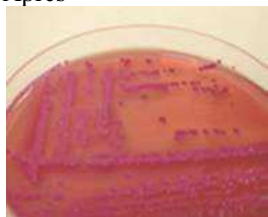
### Annexe 3: Pharmacopée européenne 9.2<sup>ème</sup> édition., Milieux spécifiques pour *E.coli*.

#### -Milieu liquide de MacConkey (MCB) :

Hydrolysate pancréatique de gélatine	20,0g
Lactose monohydrate	10,0g
Bile de bœuf déshydratée	5,0g
Pourpre de bromocrésol	10mg
Eau purifiée	1000mL
Ajuster 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.	

#### -Milieu gélosé de MacConkey (MCA) :

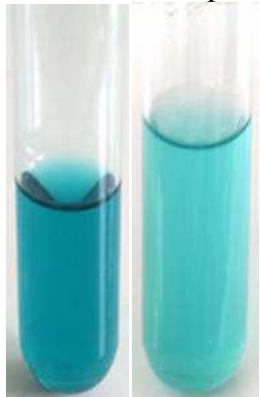
Hydrolysate pancréatique de gélatine	17,0g
Peptone de viande et de caséine	3,0g
Lactose monohydrate	10,0g
Chlorure de sodium	5,0g
Sels biliaires	1,5g
Gélose	13,5g
Rouge neutre	30,0mg
Violet cristallisé	1mg
Eaupurifiée	1000mL
Ajuster le pH pour qu'il soit de $7,1 \pm 0,2$ à 25 °C après stérilisation. Portez à ébullition pendant 1min en agitant constamment, puis stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.	

Aspect du milieu Mac Conkey Agar	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition	Caractères recherchés	Résultat
<p>Avant</p>  <p>Après</p> 	<p>Isolement par la méthode des cadrans.</p> <p>Incuber 18 à 24 h à 37 °C.</p>	<p>Ce milieu contient deux inhibiteurs de la flore Gram<sup>+</sup> :</p> <p>- les sels biliaires-</p> <p>le cristal violet</p>	<p>le lactose dont l'utilisation est révélée par l'indicateur coloré du milieu, le rouge neutre.</p>	<p>Colonies rouges entourées d'un halo opaque de la même couleur du à la précipitation des sels biliaires: lactose<sup>+</sup>colonies jaunes ou incolores :lactose<sup>-</sup></p>

## Annexe 4 : Pharmacopée européenne 9.2<sup>ème</sup> édition., Milieux spécifiques pour *Salmonella*.

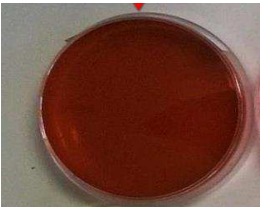

### -Milieu liquide d'enrichissement pour salmonelles Rappaport-Vassiliadis (RVB) :

Peptone de soja	4,5g
Chlorure de magnésium hexahydraté	29,0g
Chlorure de sodium	8,0g
Phosphate dipotassique	0,4g
Phosphate monopotassique	0,6g
Vert malachite	0,036g
Eaupurifiée	1000mL
Dissolvez en chauffant doucement. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé, à une température ne dépassant pas 115°C après chauffage et passage à l'autoclave.	

Aspect du milieu RVB		Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition
Avant	Après	Ensemencer largement. Incuber 24 h à température optimale	Vert malachite, MgCl <sub>2</sub> et pH acide => rendent le milieu très sélectif permettant un enrichissement en <i>Salmonella</i> à l'exception de <i>Salmonella typhi</i> et <i>Salmonella paratyphi</i> A-B et C.
			

### -Milieu gélosé xylose lysine-désoxychlorate (XLD) :



Xylose	3,5g
L-Lysine	5,0g
Lactose monohydraté	7,5g
Saccharose	7,5g
Chlorure de sodium	5,0g
Extrait de levure	3,0g
Rouge de phenol	180mg
Gélose	13,0g
Désoxycholatesodique	2,5g
Thiosulfate de sodium	6,8g
Citrate ferrique et d'ammonium	0,8g
Eau purifiée	1000mL
Ajuster le pH pour qu'il soit de 7,4 ± 0,2 à 25 °C après chauffage. Chauffez à ébullition, refroidissez à 50°C et répartissez en boîtes de Pétri. Ne chauffer pas en autoclave.	

Aspect du milieu XLD	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition	Caractères recherchés	Résultats
<p>Avant</p>  <p>Après</p> 	<p>Ensemencer la surface du milieu au moyen de l'anse (faire des stries serrées)</p> <p>Incubation : 37 °C pendant 24 - 48 h</p>	<p>fermentation des sucres : <b>lactose, saccharose, xylose</b>, repérable grâce à un indicateur de pH, le rouge de phénol (jaune en milieu acide).</p>	<p>La mise en évidence de la production d'H<sub>2</sub>S (si le pH n'est pas trop acide) grâce à la présence de thiosulfate et de citrate de fer et décarboxylation de la lysine.</p>	<p>colonies translucides sur fond rouge avec ou sans centre noir,</p> <p>colonie rouge (pas ou peu d'acidification et LDC+) à centre noir (H<sub>2</sub>S+)</p>

**Annexe 5: Pharmacopée européenne 9.2<sup>ème</sup> édition., Milieu spécifique pour *Pseudomonas aeruginosa*.**

**Milieu gélosé-cétrimide :**


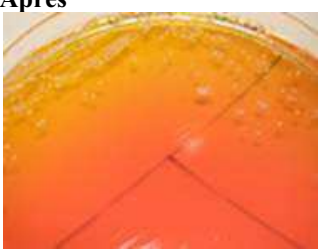
Hydrolysate pancréatique de gélatine	20,0g
Chlorure de magnésium	1,4g
Sulfate dipotassique	10,0g
Cétrimide	0,3g
Gélose	13,6g
Eaupurifiée	1000mL
Glycérol	10,0mL
<p>Chauffez à ébullition pendant 1 min en agitant. Ajustez le pH pour qu'il soit de 7,2±0,2 à 25°C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.</p>	

Aspect du milieu Cétrimide	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition	Caractères recherchés	Résultats
<p>Avant</p>  <p>Après</p> 	<p>Ensemencer la surface du milieu au moyen de l'anse.</p> <p>Incuber durant 24 heures à 37°C, voire même de préférence à 42°C (l'incubation à 42°C permet un isolement spécifique de <i>P.aeruginosa</i>).</p>	<p>Sur ce milieu de très nombreuses bactéries sont inhibées de par la présence de l'antiseptique cétrimide (bromure de N-cétyl-N, N, N-triméthylammonium) ., ainsi que par la présence de l'antibiotique acide nalidixique (inhibiteur de nombreuses bactéries à Gram négatif).</p>	<p>-pyoverdine</p> <p>-pyocyanine</p>	<p>Milieu bleu : pyocyanine</p> <p>Milieu jaune-vert : pyoverdine</p>

**Annexe 6 : Pharmacopée européenne 9.2<sup>ème</sup> édition., Milieu spécifique pour *Staphylococcus aureus*.**

**- Milieu gélosé mannitol-sel (Chapman) :**

Peptone pancréatique de caséine	5,0g
Peptone peptique de tissu animal	5,0g
Extrait de viande de bœuf	1,0g
D-Mannitol	10,0g
Chlorure de sodium	75,0g
Gélose	15,0g
Rouge de phenol	0,025g
Eaupurifiée	1000mL
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. Sterilizer à l'autoclaveselon un cycle validé.	

Aspect du milieu Chapman	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition	Caractères recherchés	Résultats
<p><b>Avant</b></p>  <p><b>Après</b></p> 	L'ensemencement doit être massif, en stries serrées ou par inondation	Ce milieu contient un inhibiteur : fortes concentrations en chlorure de sodium ( $75 \text{ g.L}^{-1}$ ), ce qui permet un isolement sélectif de <i>Staphylococcus</i> tolérant les fortes concentrations en NaCl	On peut étudier la fermentation du mannitol par virage au jaune de l'indicateur coloré, le rouge de phénol, autour des colonies.	<p><b>Les colonies mannitol + sont entourées d'une auréole jaune.</b></p> <p>Ne pas confondre la pigmentation des colonies et le virage de l'indicateur coloré.</p> <p>Ainsi des colonies pigmentées en jaunes et mannitol + : forte suspicion de <i>S. aureus</i></p>

**Noms et Prénoms :**

Bentobbal Bachir  
Boufrah Rania

**Date de soutenance :** 23/07/2019

**Thème :**

**Validation d'une méthode microbiologique pour le médicament  
« ATORVASTATINE 80 mg » dans les laboratoires pharmaceutiques LDM.**

**Résumé :** Dans notre étude, nous avons mis en œuvre les nouvelles exigences de la version 9.2 de la Pharmacopée européenne, qui assurent la validation de l'analyse microbiologique d'un médicament (ATORVASTATINE 80mg). Ce dernier est fabriqué au niveau du laboratoire de diagnostic maghrébin (LDM). L'objectif est d'obtenir un produit pharmaceutique de bonne qualité et de veiller à ce que les patients soient guéris et satisfaits.

La validation est appliquée par la contamination artificielle du produit par une variété de microorganismes bien définis. La première partie de cette étude nous a permis d'aborder les normes de l'industrie pharmaceutique et l'impact du contrôle de qualité microbiologique sur la qualité.

Après avoir défini les critères et les méthodes d'analyse, nous avons immédiatement abordé la validation microbiologique d'ATORVASTATINE 80 mg par des méthodes quantitatives DGAT « dénombrement des germes aérobies totaux » et DMLT « dénombrement des moisissures et levures totales » aussi qualitatives par la recherche spécifique des germes comme *Salmonella*, *E.coli*, *S.aureus* et *P.aeruginosa*. Ces paramètres qui ont été vérifiés à trois reprises (par l'utilisation de 3 lots différents 8224,8225,8226), nous a permis d'établir un protocole de contrôle microbiologique de routine de ce médicament par la sélection de la dilution et le diluant adéquats.

De ce fait, la validation par les DGAT et DMLT a été fixée dans le protocole final avec la dilution  $10^{-2}$ g/ml de médicament et le diluant TSE (Tryptone sel – Bouillon )+1%Tween 80 .De plus, la recherche spécifique est assurée par le choix de la dilution  $10^{-1}$ g/ml et le diluant adéquat pour chaque type de germes utilisés «TSB : Bouillon Tryptone Soja pour *Salmonella* et TSE+ 1%Tween 80 pour le reste des souches».

**Mot clés :** Validation, ATORVASTATINE 80mg, Analyses microbiologiques, DGAT, DMLT, Recherche spécifique, Pharmacopée européenne.

**Laboratoires :**

Laboratoire de Diagnostic Magrébins (LDM) .

**Président de jury:** Pr.Hamidechi Abdelhafid.

**Rapporteur :** Dr.Bataiche Insaf.

**Examinatrice :** Dr. Ghorri Sana.

**Maître de stage :** Mr.Lebisir noureddine.

**Prof. Univ. Constantine 1.**

**MCB.Univ.Constantine 1.**

**MCB. Univ. Constantine 1**

**Responsable de contrôle qualité LDM.**