



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la
Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

**Spécialité : Microbiologie, Option : Biotechnologie Fongique/Fermentation et production de
substances fongiques**

Intitulé :

Contrôle microbiologique de l'environnement dans l'industrie pharmaceutique NADPHARMADIC Production

Présenté et soutenu par :

Melle : BOUDANA Khedidja

Le : 24 /06/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : Pr. KACEM CHAOUECHE N. (UFM Constantine).

Rapporteur : Dr. KARA ALI M. (UFM Constantine).

Tuteur : Mme ABBAS A. (NADPHARMADIC Production).

Examineur : Mme BENKAHOUL M. (UFM Constantine).

*Année universitaire
2014 - 2015*

Remerciements

Nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude avant tout au bon dieu qui nous a donné la force et la volonté d'élaborer ce modeste travail.

Nous tenons à adresser nos remerciements les plus sincères et chaleureux à Mme. KARA ALI M, Docteur à l'université MENTOURI Constantine d'avoir assuré notre encadrement.

Egalement ; nous remercions M^{me} ABBAS A. pour ces conseils; qui ont éclairé notre chemin au niveau de l'entreprise NADPHARMADIC Production.

Nous tenons aussi à exprimer toute notre gratitude à le professeur Mr. KACEM CHAOUECHE N, pour avoir accepté la présidence de ce jury.

Nos sincères remerciements vont également à Mme. BENKAHOUL M. qui a accepté d'examiner notre travail avec bienveillances et nous en sommes très honorées.

Nos remerciements au président de NADPHARMADIC Production et au président de BODA Industriel ou au niveau de leur industrie, nous avons réalisé notre stage pratique de fin d'étude

En fin, nous remercions tous ceux qui nous ont aidé et ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des tableaux

Tableau1 :	Avantages et inconvénients de la méthode par sédimentation.....	5
Tableau2 :	Avantages et inconvénients de la méthode par aspiration.....	6
Tableau3 :	Avantages et inconvénients des différentes méthodes.....	7
Tableau4 :	Nombres maximale de microorganisme autorisé en Zone à Atmosphère Contrôlée (ZAC).....	8
Tableau5 :	Techniques de prélèvement des zones et sections de production.....	17
Tableau6 :	Techniques des galeries utilisées pour l'identification des bactéries et des levures.....	25
Tableau7 :	Nombre de germes obtenus du contrôle de l'air par le bio-collecteur.....	33
Tableau8 :	Nombre de germes obtenu du contrôle d'air par les boites de sédimentation.....	34
Tableau9 :	Nombre de germes dans surfaces contrôlées.....	37
Tableau10 :	Nombre d'isolat dans l'habillement du personnel.....	39
Tableau11 :	Nombre de germes obtenus du contrôle des empreintes.....	41
Tableau12 :	Résultats d'isolement des microorganismes du l'eau de rinçage.....	42
Tableau13 :	Les caractéristiques macroscopiques et microscopiques des souches fongiques.....	42
Tableau14 :	Les souches bactériennes du laboratoire, la production et l'eau purifiée.....	46
Tableau15 :	Les souches levuriennes, aspects observation macroscopique et microscopique.....	49
Tableau16 :	Identification des bactéries par les galeries API.....	49
Tableau17 :	Identification des souches levuriennes par les galeries API.....	53

Liste des figures

Figure1	Modes de formation des conidies.....	1
Figure2	Modes de groupement des conidies des champignons filamenteux.....	2
Figure3	Emplacement de la boîte de pétri sur le bio-collecteur.....	18
Figure4	Boîte de sédimentation	18
Figure5	Écouvillonnage : A, du sol ; B, de la portes.....	19
Figure6	Écouvillonnage : A, d'abdomen ; B, du poignet.....	19
Figure7	Échantillonnage des empreintes directe sur boîte de pétri.....	20
Figure8	Vannes de distribution d'eau purifiée : A, VDPOU 016 ; B, VDPOU 013....	20
Figure9	Prélèvement d'eau purifiée à partir de vanne de distribution.....	21
Figure10	Échantillon d'eau purifiée.....	21
Figure11	Poste de travail, hotte à flux laminaire vertical.....	23
Figure12	Résultats des tests positif et négatif de la galerie API Staph.....	27
Figure13	Tests positifs et négatifs pour la galerie API 20 E.....	29
Figure14	Résultats des tests positifs et négatifs de la galerie API 20 NE.....	30
Figure15	Résultats des tests positifs et négatifs des galeries.....	32
Figure16	Profil de l'isolat n°1 de la galerie API Staph.....	49
Figure17	La galerie API Staph pour isolat n°1.....	50
Figure18	Profil de l'isolat n°2 de la galerie API 20 NE.....	50
Figure19	Profil numérique de l'isolat n°3 de la galerie 20 E.....	50
Figure20	Galerie API 20 E de l'isolat n° 3.....	50
Figure21	Profil numérique de l'isolat n°4 de la galerie API 20NE.....	51
Figure22	Profil numérique de l'isolat n°5 de la galerie API Staph.....	51
Figure23	Galerie API Staph pour l'isolat n°5.....	51
Figure24	Profil numérique de l'isolat n°6 de la galerie API 20 E.....	51

Figure25	Galerie API 20 E de l'isolat n°6.....	52
Figure26	Profil numérique de l'isolat n°7.....	52
Figure27	Galerie API Staph de l'isolat n°7.....	52
Figure28	Profil numérique de l'isolat n°8.....	52
Figure29	Profil numérique de l'isolat n°9.....	53
Figure30	API Staph de l'isolat n°9.....	53
Figure31	API Candida de l'isolat n°1.....	53
Figure32	Galerie API Candida de l'isolat n°1.....	53

BPF : Bonne Pratiques de Fabrication

Cm: Centimètre

g: gramme

H: Heure

ISO: International Organization for Standardization

mL: millilitre

PCA: Plat Count Agar

Ph. Eur : Pharmacopée Européenne

SAB : Sabouraud

UFC : Unité Formant Colonie

USP : United Stats Pharmacopeia

ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée

Table des matières

1-	Introduction	1
2-	Revu bibliographique	2
2.1 -	L'industrie pharmaceutique.....	2
2.1.1-	Définition.....	2
2.1.2-	Les référentiels de l'industrie pharmaceutique.....	2
2.1.3-	La qualité au sein de l'industrie pharmaceutique.....	2
2.2 -	Présentation et situation de l'entreprise NADPHARMADIC Production...	3
2.3-	Contrôle microbiologique de l'environnement en industrie pharmaceutiques	5
2.3.1-	contrôle microbiologique de l'air.....	5
2.3.2-	Contrôle microbiologique des surfaces.....	6
2.3.3-	Contrôle particulière de l'environnement.....	7
2.3.4-	Contrôle du personnel.....	7
2.4-	Contamination microbiologique.....	8
2.5-	Méthodes d'identification des microorganismes.....	9
2.5.1-	Identification des champignons.....	9
2.5.2-	Identification des bactéries	15
3-	Matériel et méthodes	17
3.1-	Échantillonnage.....	17
3.2-	Contrôle microbiologique.....	17
3.3-	Isolement des microorganismes présents dans l'environnement	22
3.3.1-	Air.....	22
3.3.2-	Surfaces et Habillages.....	22
3.3.3-	Empreintes.....	22
3.3.4-	Eau purifiée.....	22
3.4-	Purification des souches.....	23
3.4.1-	Moisissures.....	23
3.4.2-	Bactéries et levures.....	23
3.5-	Identification des souches.....	23
3.5.1-	Observation macroscopique.....	23

3.5.2-	Observation microscopique.....	24
3.5.3-	Tests biochimiques.....	25
4-	Résultats et discussion	33
4.1-	Contrôle microbiologique.....	33
4.1.1-	Contrôle de l'air	33
4.1.2 -	Contrôle par écouvillonnage	37
4.1.3 -	Contrôle des empreintes.....	40
4.1.4 -	Contrôle de L'eau de rinçage.....	42
4.2-	Identification des souches isolées.....	42
4.2.1-	Moisissure.....	42
4.2.2-	Bactéries et levures.....	45
5-	Conclusion	55
6-	Résumé	56
7-	Abstract	57
8-	ملخص	58
9-	Références bibliographiques	59

Annexes

Glossaire

Introduction

1- Introduction

L'industrie pharmaceutique doit apporter des garanties de qualité et d'innocuité de ces produits misent sur le marché. Face aux exigences éthiques et réglementaires, il s'agit d'une réelle responsabilité industrielle qui nécessite de prendre en considération les attentes du consommateur, et de respecter la réglementation. (BPF, 2011)

Du simple test visant à garantir la conformité du produit avant sa mise sur le marché, le contrôle de la qualité (service microbiologique) et plus exactement le contrôle microbiologique de l'environnement dans l'industrie pharmaceutique est devenu un outil d'évaluation au service des objectifs de sécurité et de conformité pour les différents process de la fabrication.

Notre travail a été réalisé dans le cadre du contrôle microbiologique de l'environnement dans l'industrie pharmaceutique, dont la partie revue bibliographique qui parle de la présentation et la situation de l'entreprise NADPHARMADIC Production, une définition du contrôle microbiologique de l'environnement dans l'industrie pharmaceutique, les techniques de contrôle microbiologique, les microorganismes qui occupent l'environnement de l'industrie pharmaceutique, et les méthodes d'identification des microorganismes.

En outre, nous abordant dans la partie pratique les différents prélèvements qui ont été réalisés pour le contrôle microbiologique, identification des isolats obtenus (bactéries, levures, moisissures).

En fin, nous terminons par une conclusion où nous montrons les apports de notre travail, les résultats obtenus ainsi des recommandations, l'entreprise entraine de les suivre.

Revue
Bibliographique

2- Revu bibliographique

2.1- L'industrie pharmaceutique

2.1.1- Définition

L'industrie pharmaceutique est un secteur d'activité dynamique et en plein essor. Sa particularité réside dans le fait qu'elle fabrique des médicaments qui seront administrés à l'homme à des fins thérapeutiques, mais aussi à des fins curatives ou préventives. Le médicament n'est pas un produit banal. Le consommer n'est pas un but, mais un moyen pour rétablir ou maintenir un état de santé affecté par une maladie ou par le vieillissement (BPF,2011).

2.1.2- Les référentiels de l'industrie pharmaceutique

Les référentiels de l'industrie pharmaceutique regroupent un ensemble d'éléments formant un système de référence. Différents types de référentiels s'appliquent au secteur de la santé et plus particulièrement à l'industrie pharmaceutique. On distingue deux catégories de référentiels:

- ceux d'application obligatoire; ils découlent de textes de loi (les BPF, les Pharmacopées ...)
- et ceux d'application volontaire (normes ISO 9000 ...)

2.1.3- La qualité au sein de l'industrie pharmaceutique

La mise en œuvre d'une politique de la qualité, a pour objet de garantir dans l'intérêt de la santé publique que les médicaments délivrés, répondent aux spécifications de l'autorisation de mise sur le marché afin d'offrir et de conserver la qualité, la sécurité et l'efficacité requises pour l'usage prévu. Pour atteindre ces objectifs, il existe une organisation clairement définie et établie qui englobe les bonnes pratiques de fabrication (BPF) et le contrôle qualité.

- *Assurance Qualité*

L'Assurance Qualité (AQ) permet une organisation efficace de la qualité depuis la réception des matières premières jusqu'à l'expédition des produits finis.

Dans les BPF l'AQ représente " l'ensemble des mesures prises pour s'assurer que les médicaments fabriqués sont de la qualité requise pour l'usage auquel ils sont destinés." Un des outils essentiels de l'AQ est la validation. Valider, c'est construire la qualité dans le produit (Roman, 1997).

- ***Le Contrôle Qualité***

Le contrôle qualité est une partie des BPF qui concerne les procédures relatives à l'échantillonnage, aux spécifications, aux analyses, à la documentation et à la mise en circulation. Pour un bon fonctionnement du contrôle qualité des exigences de base sont requises. Des installations appropriées, du personnel compétent et des méthodes approuvées doivent être disponibles pour effectuer l'échantillonnage, l'inspection et l'analyse des matières premières, du matériel d'emballage, des produits intermédiaires, en vrac ou finis et pour contrôler au besoin, les conditions environnementales pour se conformer aux bonnes pratiques de fabrication (BPF).

2.2- Présentation et situation de l'entreprise NADPHARMADIC Production



Dès sa création en 2007, et contrairement à ses concurrents, NADPHARMADIC-PRODUCTION s'est lancée directement dans la production de médicaments en Full-process « fabrication à partir de la matière première », en évitant le passage par le conditionnement du vrac ou la fabrication à partir des premix, s'alignant ainsi au rang des vrais industriels pharmaceutiques. Le premier lot de produit a été fabriqué le 27 février 2012.

Située dans la zone industrielle El-Rhumel N°24, Constantine et étant spécialisée dans la fabrication des médicaments génériques, cette dernière dispose d'équipements technologiques de haute performance pour sa production.

➤ **Structure**

NADPHARMADIC Production est constituée d'un bloc administratif et un bloc technique, ce dernier comprend :

Le rez-de-Chaussée (RDC) :

- La section du conditionnement primaire
- La section du conditionnement secondaire
- La zone de stockage.

Le 1^{er} étage :

- Le laboratoire de contrôle qualité ;
- La zone technique relative aux RDC et au 1^{er} étage.

Le 2^{ème} étage :

- La section de fabrication ;
- Zone technique relative au 2^{ème} étage.

➤ **Produits**

Le site de production est conçu pour la fabrication des :



2.3- Contrôle microbiologique de l'environnement en industrie pharmaceutiques

Les BPF nous imposent un contrôle de l'air par prélèvement actif et par sédimentation, un contrôle de surface par gélose contact et en fin un contrôle par empreintes des gants des opérateurs travaillant en ZAC. (BPF, 2011)

2.3.1- Contrôle microbiologique de l'air

❖ *Méthode par sédimentation- prélèvement passif de l'air*

Une boîte de pétri contenant un milieu gélosé est laissée ouverte pendant une durée prédéterminée, afin de recueillir les particules par sédimentation.

Tableau 1 : Avantages et inconvénients de la méthode par sédimentation

Avantages	Inconvénients
Pas besoin de matériel spécifique	Temps de prélèvement long (jusqu'à 4h par boîte)
Méthode peu coûteuse	Seuls les microorganismes qui tombent sur la gélose seront détectés, pas quantitatif.

❖ *Méthode par aspiration- prélèvement actif de l'air*

Un certain volume d'air est aspiré au travers d'un crible qui permet faire s'impacter les microorganismes et particules sur une boîte de pétri contenant un milieu gélosé. Le volume aspiré doit être représentatif de la zone considérée. Le débit d'air doit être suffisant pour pouvoir prélever 1m³ d'air dans un temps raisonnable et afin d'obtenir une vitesse d'impaction appropriées, afin d'assurer l'impaction des particules, tout en assurant la conservation de la viabilité des particules.

En classe A, la vitesse de l'air aspiré doit être iso-cinétique à la vitesse du flux d'air généré. Ceci permet d'éviter la génération involontaire des flux d'air. (BPF, 2011)

Tableau 2 : Avantages et inconvénients de la méthode par aspiration

Avantages	Inconvénients
Facile d'utilisation	Altération de la viabilité des microorganismes si temps de prélèvement trop long.
Maniable	Dessèchement de la gélose si temps de prélèvement trop long.
Rapidité de prélèvement (environ 10min pour 1m ³ d'air prélevé)	Coût du matériel.

2.3.2- Contrôle microbiologique des surfaces

Toutes les surfaces doivent faire l'objet d'un monitoring, que ce soient les sols, les murs ou les surfaces des équipements. (US FDA, 2004)

Différentes méthodes existent. Celles-ci sont propres à chaque entreprise et doivent être validées par des tests appropriés.

❖ Méthodes par empreintes

- Boite contact : boîte de pétri possédant un ménisque de milieu de culture convexe. La boîte de pétri est fixée à un appareil permettant une application facilitée sur la surface à contrôler. Cet appareil dispose d'une alarme émettant un son indiquant la fin du prélèvement lorsque le temps et la force d'application ont été respectés. On applique directement ce milieu de culture sur la surface à prélever
- Lame gélosé : lame recouverte de chaque côté par un milieu de culture. On l'applique directement sur la surface à contrôler.
- Pétrifilm : milieu gélosé déshydraté placé entre deux films. On l'applique directement sur la surface à contrôler après réhydratation.

❖ Méthode par écouvillonnage

Écouvillon sec ou humidifié qui est frotté contre la surface à contrôler. Cet écouvillon sert ensuite à ensemer des milieux de cultures.

❖ *Méthodes par chiffonnettes ou épongettes*

La méthodologie est identique à l'écouvillonnage.

Après prélèvement, les milieux de cultures sont mis à incuber à température adéquate.

Tableau 3 : Avantages et inconvénients des différentes méthodes

	Boite Contact	Lame gélosée	Écouvillonnage
Prêt à l'emploi	oui	oui	non
Facile d'utilisation	oui	oui	non
Méthode standardisée	oui	non	non
Milieu sélectif possible	oui	oui	oui
Action mécanique possible	non	non	oui
Utilisation sur des surfaces non planes possible	non	non	oui

2.3.3- Contrôle particulière de l'environnement

Le contrôle particulière de routine permet de détecter rapidement toute variation de tendance environnementale en zone classée. Ce monitoring se fait par des compteurs particulières placés à des endroits stratégiques. Un volume d'air prédéfini est prélevé de façon régulière. Tout dépassement de seuil induit une mise en alarme du système. (BPF, 2011).

Ce contrôle permet ainsi de montre que la classification de la salle est maintenue.

La sonde d'échantillon doit être placée verticalement, dirigée vers le haut.

2.3.4- Contrôle du personnel

Des échantillons microbiologiques des surfaces des gants de chaque opérateur doivent être prélevés. Des prélèvements supplémentaires peuvent être réalisés pour le personnel travaillant

en zone de classe A/B, tels que par exemple un contact de la cagoule, des avant-bras et du torse.

2.4- Contamination microbiologique

Ce type de contaminations regroupe les microorganismes vivants tels que les levures les moisissures (*Penicillium*, *Aspergillus*), les bactéries (*Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Vibrions*, *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Pseudomonas* et autres aérobies Gram négatif, *Listeria*, *Brevibacterium*, *Propionibacterium*, *Bactéries lactiques*, *Bifidobactéries*, *Bacillus*, *Clostridium*) et virus. Ces organismes ont besoin, pour se développer et se multiplier, de conditions d'humidité et de chaleur.

La présence de microorganismes dans la préparation des médicaments peut engendrer différents problèmes (Ernt T. Rietschel, 1994).

On entend par biocontamination « la contamination d'une matière, d'un appareil, d'un individu, d'une surface, d'un liquide, d'un gaz par des particules viables » (ISO14644-1,1999), (BPF, 2011).

Tableau 4: Nombres maximale de microorganisme autorisé en Zone à Atmosphère Contrôlée (ZAC)

Limite recommandé de la contamination microbiologique (a)				
classe	Échantillon d'air UFC/m ³	Boite de pétri (diam.:90 mm), UFC/4heures (b)	Gélose de contact (diam.:55 mm), UFC/ plaque	Empreintes de gant (5 doigts) UFC/ gant
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Notes :

(a) Il s'agit de valeurs moyennes.

(b) Certaines boites de pétri peuvent être exposées pendant moins de quatre heures.

À noter qu'en classe Cet D les empreintes de gants ne sont pas obligatoires car le port de gant n'est pas une obligation réglementaire (BPF,2011).

2.5- Méthodes d'identification des microorganismes

2.5.1- Identification des champignons

L'identification des très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments et d'en altérer les qualités, voire de produire des mycotoxines est une étape indispensable à l'évaluation du risque mycotoxique.

Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Toutefois, la complexité du règne fongique fait, qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification.

❖ *Identification morphologique*

L'identification d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères cultureux (température et vitesse de croissance, milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...) (Cahagnier et Richard-Molard, 1998).

➤ *Critères d'identification macroscopique*

L'aspect des colonies représente un critère d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses ; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (l'absence ou pauvreté du mycélium aérien).

Le relief des colonies : il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peut être variable (molle, friable, élastique ou dure).

La taille des colonies : Elle peut être très variable en fonction des genres fongiques : petites colonies (*Cladosporium*) ou au contraire, colonies étendues, envahissantes (*Mucor*, *Rhizopus*).

La couleur des colonies est un élément très important d'identification ; les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleue, le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*).

Les structures de fructification : la présence ou l'absence, au centre de la colonie, des structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pycnides) est aussi un élément important de diagnose (Botton *et al.*, 1990).

➤ **Critères d'identification microscopique**

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au Bleu Cotton. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants de diagnose (Cahagnier et Richard-Mollard, 1998).

Le thalle : tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes) qui, ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium ; le thalle peut être siphonné ou septé :

- **Le thalle siphonné**, constitué d'éléments tubulaires peu ou pas ramifié, de diamètre large et irrégulier (5-15 μm), non cloisonné est caractéristique des Zygomycètes ;
- **Le thalle septé ou cloisonné**, constitué de filaments de diamètre étroit (2-5 μm) et régulier, divisé par des cloisons en articles uni ou pluricellulaires est caractéristique des Ascomycètes, Basidiomycètes et Deutéromycètes (Badillet *et al.*, 1987).

Les spores : qui sont le produit de la reproduction asexuée peuvent être endogènes ou exogènes :

- **Les spores endogènes (endospores)** sont produites à l'intérieur d'un sac fermé (sporange), porté par un filament spécialisé (sporangiophore). Ces spores, que l'on observe par exemple chez les Mucorales, sont libérées par le déchirement de la paroi de sporange à maturité.

- **Les spores exogènes (conidies)**, retrouvées chez les Ascomycètes, Basidiomycètes et Deutéromycètes, sont formées par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée (cellule conidiogène).

L'examen des spores et de leur organisation est une étape importante de l'identification fongique (Campbell *et al.*, 1996).

- **Aspect des spores** : D'après la forme et les modalités de septation, on distingue 5 groupes de spores
 - Les amérospores : spores unicellulaires de petite taille (*Penicillium, Aspergillus*)
 - Les didymospores : spores bicellulaires (*Trichothecium*) ;
 - Les phragmospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales (*Curvularia*) ;
 - Les dictyospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (*Alternaria*) ;
 - Les scolécospores: spores étroites, effilées, souvent incurvées et cloisonnées transversalement (*Fusarium*).

Modes de formation des conidies

- **Le mode thalique** : la formation des spores s'effectue à partir d'éléments préexistants du thalle. On en distingue deux variantes principales :
 - le type thalique solitaire, ex: *Chrysosporium*
 - le type thalique arthrique, ex: *Geotrichum*
- **Le mode blastique** : les spores sont formées par bourgeonnement à partir de cellules conidiogènes différenciées ou pas, puis une cloison se forme à l'émergence de bourgeon et la cellule fille (la spore) se sépare de la cellule mère. On en distingue plusieurs variantes :
 - le type blastique acropète, ex: *Cladosporium, Alternaria*
 - le type blastique synchrone, ex: *Botrytis*
 - le type blastique sympodial, ex: *Beauveria*

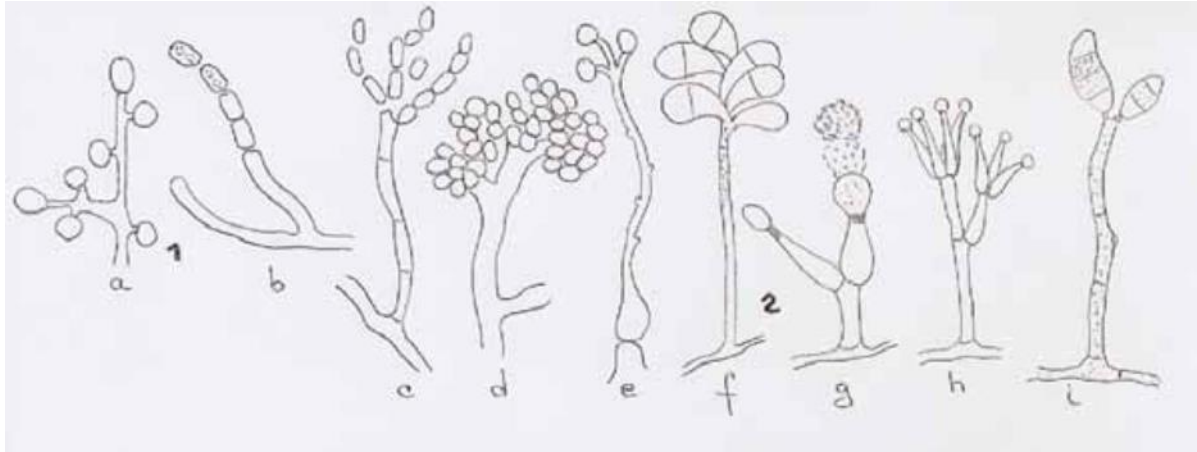


Figure 1 : Modes de formation des conidies

1. Formation thallique : a : solitaire (*Chrysogenum*), b : arthritique (*Geotrichum*)
2. Formation blastique : c : acropète (*Cladosporium*), d : synchrone (*Botrytis*), e : sympodial (*Beauveria*), f : régressif (*Trichothecium*), g : annelidique (*Scopulariopsis*), h : phialidique (*Penicillium*), i : poric (*Curvularia*).
 - le type blastique régressif, ex: *Trichothecium*
 - le type blastique percurrent (annelidique), ex : *Scopulariopsis*
 - le type blastique phialidique, ex: *Aspergillus*, *Penicillium*
 - le type blastique porique, ex : *Alternaria*, *Curvularia* (Figure 1) (Botton *et al.*, 1990).

Mode de groupement des conidies

Les conidies sont, en général, regroupées à l'extrémité de la cellule conidiogène.

L'organisation de ce regroupement est aussi un facteur d'identification. Les principaux types sont :

- grappes, ex. *Beauveria*, *Trichothecium*
- masse, ex. *Botrytis*
- têtes ou balles, ex. *Acremonium*, *Trichoderma*
- chaînes basipètes, ex. *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Penicillium*
- chaînes acropètes, ex. *Cladosporium*, *Alternaria* (Figure 2) (Botton *et al.*, 1990).

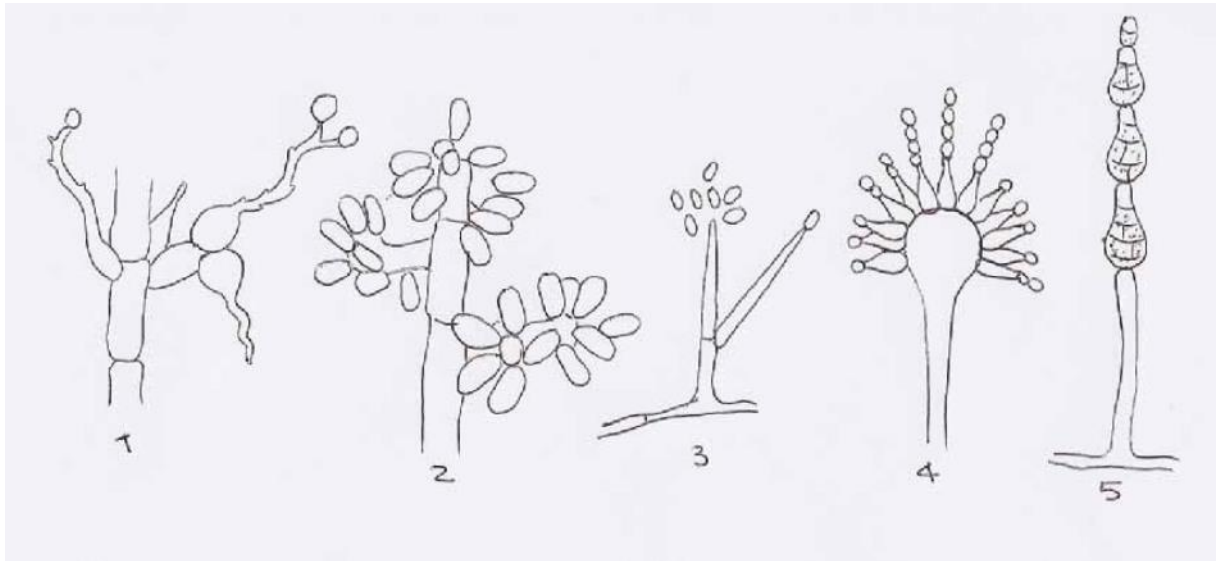


Figure 2 : Modes de groupement des conidies des champignons filamenteux

1. grappes (*Beauveria*), 2. Masses (*Botrytis*), 3. Têtes (*Acremonium*), 4. Chaînes basipètes (*Aspergillus*), 5. Chaînes acropètes (*Alternaria*).

Mode d'implantation des cellules conidiogènes

Les cellules conidiogènes peuvent naître de structures plus ou moins élaborées issues du mycélium végétatif. Ceci est utilisé pour l'identification de genres et d'espèces (de Hoog et Guarro, 1995). Les cellules conidiogènes non différenciées sont intégrées dans les hyphes, intercalaires ou situées dans une position terminale (ex : *Aureobasidium*).

Les cellules conidiogènes sont différenciées. Elles peuvent alors être : directement insérées sur les filaments végétatifs (ex : *Acremonium*, *Fusarium*) ;

- bien distinctes des filaments végétatifs, portées par des conidiophores dispersés sur le thalle végétatif :

- a) regroupées à l'extrémité dilatée du conidiophore, formant une tête (ex :

Aspergillus) ;

- b) regroupées en verticille au sommet du conidiophore, formant un pinceau (ex : *Penicillium*) ;

- c) disposées en verticille le long du conidiophore (ex : *Verticillium*) ;

- bien distinctes des filaments végétatifs, portées par des conidiophores groupés :
- conidiophores disposés parallèlement les uns aux autres, agrégés en une gerbe sporifère nommée corèmie (ex : *Graphium*) ;
- conidiophores agrégés en coussinets superficiels nommé sporodochie (ex : *Myrothecium*).

❖ **Identification génétique**

L'identification d'espèces fongiques est traditionnellement fondée sur les caractéristiques culturales et morphologiques macroscopiques et microscopiques. Cette identification nécessite donc, en général, plusieurs jours de culture (7 à 10 jours le plus souvent). La culture sur des milieux spécifiques peut être nécessaire pour obtenir la formation de conidies et, dans certains cas, l'absence d'apparition de conidies rendra impossible l'identification du mycélium. Par conséquent, de nombreuses études ont visé à développer des méthodes outils d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) et ne nécessitant plus obligatoirement un examen morphologique (Peterson, 2006 ; Hinrikson *et al.*, 2005 ; Feuilhade de Chauvin, 2005 ; Jin *et al.*, 2004 ; Reiss *et al.*, 1998).

Les méthodes les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction) de certaines régions spécifiques comme le gène codant pour la sous-unité 28S ribosomale (région D1-D2) et des régions ITS1 et ITS2 (Hinrikson *et al.*, 2005).

L'identification moléculaire d'espèces fongiques est, à l'heure actuelle, surtout appliquée en mycologie médicale pour différencier les espèces d'intérêt. En effet, les infections fongiques envahissantes sont de plus en plus identifiées comme cause primaire de morbidité et de mortalité, particulièrement chez les immunodéficients (de Aguire, *et al.*, 2004).

L'identification moléculaire peut permettre une différenciation rapide des différentes espèces d'*Aspergillus* ainsi que celle d'autres moisissures ou levures, pathogènes opportunistes (Dial, 2007 ; de Aguire, *et al.*, 2004 ; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2007 ; Paterson *et al.*, 2000). Les sondes d'oligonucléotide, dirigées vers la région ITS 2 de l'ADN ribosomal de *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. ustus*, et *A. versicolor* ont permis la différenciation de 41 isolats et n'ont donné aucune

réaction faussement positive avec 33 espèces *d'Acremonium*, *Exophiala*, *Candida*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, ou d'autres espèces d'*Aspergillus* (de Aguire, *et al.*., 2005).

Cette méthode est aussi utilisée pour différencier et identifier les moisissures responsables des altérations, principalement les espèces de *Penicillium* (Boysen *et al.*., 2000 ; Hageskal *et al.*, 2006).

En ce qui concerne les *Fusarium*, les méthodes moléculaires existantes donnent des résultats fréquemment peu concluants et l'examen morphologique classique semble encore une méthode indispensable à l'identification des espèces appartenant à ce genre fongique (Healy *et al.*., 2005).

De nombreux travaux visent aussi à utiliser les progrès de la biologie moléculaire afin de dépister rapidement les souches fongiques toxigènes

Si à l'heure actuelle les outils de l'identification moléculaire ne semblent pas en mesure de remplacer l'identification morphologique classique, il est probable que dans les années à venir, ces méthodes représenteront des outils particulièrement utiles pour la détection et l'identification fongique.

2.5.2- Identification des bactéries

❖ *L'identification présomptive*

• **L'examen microscopique**

Après coloration de Gram qui permet de fournir une réponse rapide lorsque l'aspect morphologique est évocateur (bacilles à Gram négatif fusiformes évoquant *F. nucleatum*, bacilles à Gram positif sporulés évoquant *Clostridium spp.*...). Toutefois, certaines espèces de bactéries à Gram positif peuvent apparaître Gram négatif : *C. ramosum*, *Clostridium* du groupe *clostridioforme*, *C. innocuum*, *Peptoniphilus asaccharolyticus* (Johnson., *et al*1995).

• *L'aspect des colonies*

- **La pigmentation** : noire des colonies de *Porphyromonas spp.* et de certaines espèces de *Prevotella spp.*
- Brun-rouge des colonies d'*Actinomyces odontolyticus*

- **Odeur** : odeur de crottin de cheval caractéristique de *C. difficile*
- **hémolyse** : double zone d'hémolyse observée autour des colonies de *C. perfringens*

- la recherche de la mobilité et de la présence de spores

- la production de catalase

- la croissance sur des milieux sélectifs

❖ *L'identification définitive*

peut être obtenue par l'étude de caractères biochimiques grâce à des méthodes conventionnelles qui permettent d'explorer le métabolisme des hydrates de carbone (fermentation, hydrolyse), le métabolisme protéique (présence d'une nitrate, production d'indole, hydrolyse de l'urée et de la gélatine, action sur le lait), le métabolisme des lipides (lécithinase, lipase) et le métabolisme du soufre (production d'hydrogène sulfuré). Alternativement, des galeries commercialisées permettant l'étude de certains de ces caractères ou la détection d'enzymes préformées peuvent être utilisés mais leur emploi nécessite une bonne connaissance des caractères phénotypiques en raison de bases de données parfois incomplètes.

L'identification de certaines espèces peut nécessiter le recours à des techniques chromatographiques (étude des produits terminaux du métabolisme par chromatographie en phase gazeuse) ou à des techniques de biologie moléculaire reposant sur le séquençage de gènes, principalement ceux codant l'ARN ribosomal 16S (44). Cependant, ces techniques restent l'apanage des laboratoires spécialisés.

*Matériel et
Méthodes*

3- Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur le contrôle microbiologique de l'environnement dans l'industrie pharmaceutique. Le contrôle est effectué dans l'entreprise NADPHARMADIC Production.

3.1- Échantillonnage

Les prélèvements ont été réalisés au niveau du laboratoire de contrôle qualité (département de la microbiologie) et de la zone de fabrication (salle de granulation, d'enrobage et de compression), conditionnement (conditionnement primaire et secondaire) sur ;

- L'air
- Les surfaces (sol, panneau, porte, paillasse, équipements)
- Habillage (blouse et tenue de production)
- Empreintes du personnel de production
- Eau purifiée (eau de rinçage de verrerie et d'équipements)

3.2- Contrôle microbiologique

Les différentes techniques de prélèvement ont été résumées dans le tableau ci-dessous (tableau5)

Tableau 5: Techniques de prélèvement des zones et sections de production

Échantillon	Techniques d'échantillonnage
Air	<ul style="list-style-type: none"> • Prélèvement 1 ; utilisation de biocollecteur: <p>Le biocollecteur a été placé à un mètre du sol au niveau du centre de la salle, avec la fermeture des portes et du sas, un échantillon prélevé dans un 1 m³ par salle, l'essai est mené à double ; échantillonnage sur milieu de culture PCA et sur le milieu SAB.</p> <p>La couverture du biocollecteur a été désinfectée après chaque utilisation à l'aide d'une compresse stérile imbibée d'un agent désinfectant.</p>



Figure 3: Emplacement de la boîte de pétri sur le bio-collecteur

Prélèvement 2 ; Utilisation de boîte de sédimentation :

Deux boîtes de pétri ont été déposées l'une contenant le milieu PCA et la deuxième le milieu SAB, au niveau de chaque point critique (Figure 4) l'essai a été réalisé en activité pendant (04) heures.



(A)



(B)



(C)



(D)

Figure 4: Boîte de sédimentation : A, près d'équipement ; B, dans un coin ; C, sur incubateur ; D, sur paille

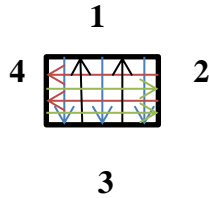
Surface

• **Prélèvement par écouvillonnage :**

À l'aide d'écouvillon stérile préalablement humidifié dans de l'eau

et

physiologique stérile, le prélèvement a été réalisé par le passage de l'écouvillon sur la zone d'échantillonnage définie de 5x5 Cm² en stries parallèles rapprochées en le faisant tourner légèrement, puis toujours sur la même zone en stries perpendiculaires aux premières, suivant le schéma ci-dessous ;



Habillage



(A)



(B)

Figure 5: Écouvillonnage : A, du sol ; B, de la portes

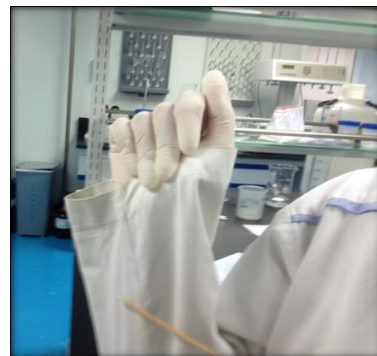
Cette méthode a été appliquée pour le contrôle des surfaces sur les différents points critiques (sol, panneau, portes, équipements) et pour le contrôle d'habillage au niveau du : coude, poignet et abdomen.

Une fois terminé, la zone du point échantillonné est désinfectée avec de l'alcool à 70%.

L'échantillon prélevé est de suite acheminé au laboratoire de contrôle microbiologique, ce dernier ne doit pas dépasser un délai de 2 heures ± 1 de stockage.


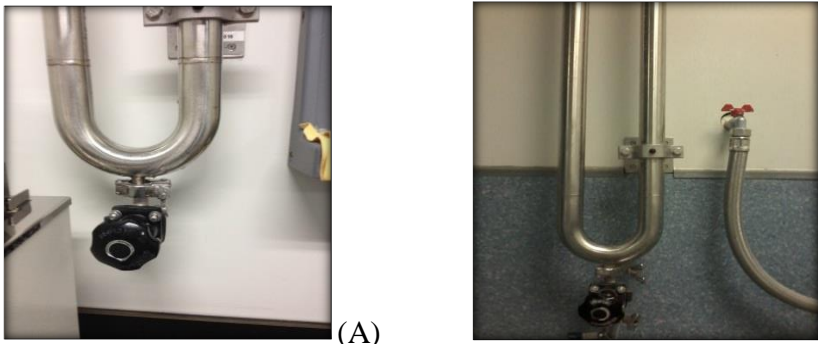


(A)



(B)

Figure 6: Écouvillonnage : A, d'abdomen ; B, du poignet

<p>Empreintes</p>	<ul style="list-style-type: none">• Le prélèvement des empreintes : <p>La méthode de prélèvement est basée sur le contact direct des doigts des opérateurs sur le milieu gélosé SAB et PCA, avec une légère pression.</p>  <p>Figure 7: Échantillonnage des empreintes directe sur boîte de pétri</p>
	<ul style="list-style-type: none">• Le prélèvement de l'eau de rinçage : <p>L'échantillonnage est réalisé par la collection d'eau purifiée à partir des vannes de distribution : VDPOU013 au niveau de la production et VDPOU016 au niveau du laboratoire,</p>  <p>Figure 8: Vannes de distribution d'eau purifiée : A, VDPOU 016 ; B, VDPOU 013</p>

Eau de rinçage

La vanne de sortie d'eau purifiée est premièrement désinfectée par de l'alcool à 70°, après 5min d'écoulement d'eau la récolte de la quantité nécessaire pour l'analyse a été effectuée dans des flacons vides stériles et préalablement désinfectés de l'extérieur,

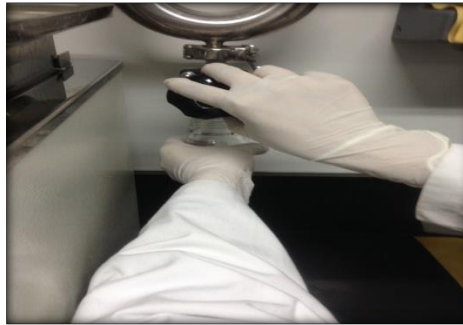


Figure 9: Prélèvement d'eau purifiée à partir de vanne de distribution

Le prélèvement est identifié et renseigné : le point de prélèvement, la date et l'heure, la quantité prélevée et le visa du préleveur, ce dernier est de suite acheminé au laboratoire pour contrôle microbiologique.

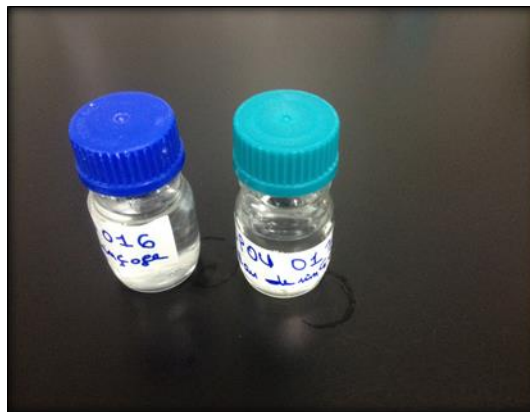


Figure10: Échantillon d'eau purifiée

3.3- Isolement des microorganismes présents dans l'environnement

L'isolement des bactéries et des champignons a été réalisé par les méthodes suivantes :

3.3.1- Air

Une incubation directe des boîtes de pétries du prélèvement par le bio-collecteur et les boîtes de sédimentation à 30-35°C pour le milieu PCA pendant 48H à 72H et à 20-25°C pour le milieu sabouraud pendant 5 jours.

3.3.2- Surfaces et Habillages

Ensemencement à l'aide de micropipette à embout stérile de 0.1 ml d'échantillon prélevé avec le milieu TSA et Sabouraud, par la technique d'étalement en surface à l'aide d'un râteau stérile, ensuite, une incubation à 30-35°C pendant 48H à 72H pour le milieu TSA et 20-25°C pendant 5 jours pour le milieu Sabouraud.

3.3.3- Empreintes

Les empreintes des opérateurs ont été prises au cours d'activité sur le milieu Sabouraud et PCA. Autant que les échantillons ont été incubés à 30-35°C pendant 2 à 3 jours pour PCA et 20-25°C pendant 5 jours pour Sabouraud.

3.3.4- Eau purifiée

L'analyse a été réalisée sous hotte à flux laminaire vertical type (poste de sécurité microbiologique) PSM classe II en présence de bec bunsen. Après désinfection du plan de travail avec l'isopropanol à 70%, et l'introduction des pièces de la rampe de filtration préalablement stérilisés à l'intérieur de la hotte avec le matériel et les instruments nécessaires. Une quantité de 5ml d'eau purifiée a été filtrée, à la fin la membrane filtrante a été déposée sur le milieu gélosé R2A (voir annexe1) et les boîtes de pétri ont été incubées à 30-35°C pendant 5 jours.

Les résultats ont été exprimés en nombre d'UFC/ml comme suit :
 $R = \text{nb de colonies dénombrées} / \text{volume filtré}$, avec un seuil d'intervention de 100UFC/ml.



Figure 11: Poste de travail, hotte à flux laminaire vertical

3.4- Purification des souches

3.4.1- Moisissures

La purification des moisissures a été effectuée sur le milieu Sabouraud par piqûre centrale à partir des boîtes d'isolement, l'incubation des boîtes a été réalisée à 20-25°C pendant 5 jours.

Ce milieu de culture contient un antibactérien : le chloramphénicol (Philippe, 2014)

3.4.2- Bactéries et levures

Après développement des colonies, les bactéries et les levures ont été repiquées dans les mêmes milieux de cultures PCA et Sabouraud successivement. La purification a été effectuée par la méthode des stries. L'incubation des bactéries a été faite à 30-35°C pendant 2-3 jours et à 20-25°C pendant 5 jours pour les levures (Talbert et Willoquet, 2004).

3.5- Identification des souches

L'identification des bactéries, levures et moisissures a été effectuée par l'observation macroscopique et microscopique en mettant en évidence quelques caractéristiques clefs de détermination. Ainsi que l'identification est basée sur l'étude des caractères biochimiques.

3.5.1- Observation macroscopique

L'étude de l'aspect macroscopique des bactéries et levures consiste en une observation à l'œil nu de la taille, la forme de la colonie, transparence, élévation de la colonie, type de colonie et le relief (Camille, 2007). Par contre l'observation des moisissures est faite sur la face (types et aspects de colonies, formes et couleurs de spores) et sur le revers de la boîte (Botton *et al.*, 1990).

3.5.2- Observation microscopiques

❖ *Moisissures*

L'identification microscopique des champignons repose sur plusieurs méthodes, les deux méthodes utilisées sont celle du lactophéno et du scotch (test du drapeau), cette dernière est effectuée pour les cultures filamenteuses et poudreuses (Chabasse et *al.*, 2002).

- **Méthode du Scotch :** un petit morceau de scotch est appliqué sur la face collante de la colonie à l'aide d'une pince puis déposé sur une lame propre et sèche (Chabasse et *al.*, 2002).
- **Méthode du Lactophéno :** un fragment de la colonie est prélevé avec un peu de gélose à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame propre dans une goutte de colorant (Lactophéno bleu-coton), recouvert d'une lamelle qui écrase la préparation (Chabasse et *al.*, 2002).

L'observation microscopique est effectuée au microscope optique au grossissement (GX40).

❖ *Bactéries et levures*

➤ **Observation à l'état frais**

Cette technique permet l'observation des bactéries et levures vivantes et la détermination de leurs morphologies. Il est souvent possible de visualiser la mobilité des cellules. La technique consiste à déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur lame en verre propre, puis à l'aide d'une anse de platine stérile, apporter un prélèvement bactérien de la colonie à identifier et la dissocier dans la goutte d'eau physiologique, ensuite recouvrir la lame par une lamelle en évitant la formation de bulles d'air. L'observation est réalisée au microscope optique à l'objectif (GX40) (Singleton, 2005).

➤ **La coloration de Gram**

La coloration de Gram a été mise au point en 1884 par le bactériologiste *Danois Hans Christian Gram*. Cette technique est l'une des méthodes de coloration la plus utile, elle permet de diviser les bactéries en deux grands groupes : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (Tortora et *al.*, 2003). Cet examen a été effectué selon la méthode classique suivante ; Les frottis examinés sont étalés à l'aide d'une anse de platine avec de l'eau physiologique stérile sur les surfaces des lames. Ces derniers sont ensuite séchés et fixés à la chaleur de la flamme du bec bunsen (à proximité). Les frottis préparés sont recouvert pendant 1 minute par la solution de violet de gentiane (colorant basique), ils sont ensuite recouvert pendant 30 secondes par une solution de *lugol* (solution aqueuse d'iode et

d'iodure de potassium) qui agit comme un mordant, c'est-à-dire, il augmente les interactions entre le colorant et la cellule pour que cette dernière soit contrasté. Puis, le mélange alcool-acétone est versé goutte à goutte sur la lame inclinée obliquement (pour la décoloration) jusqu'à ce que la goutte devienne incolore ; juste après la décoloration les lames sont lavées immédiatement à l'eau de robinet.

Dans la dernière étape, les frottis sont soumis à une contre coloration de 30 secondes à la fuchsine basique. Après l'excès de la fuchsine est jeté et les frottis sont séchés par le papier buvard et examinés par microscope optique à l'objectif (X 40), et à immersion (X100).

La couleur violette due au violet de gentiane est l'aspect caractéristique des bactéries Gram positif, et la couleur rose due à la fuchsine est l'aspect caractéristique des bactéries Gram négatif (Tortora *et al.*, 2003).

3.5.3- Tests biochimiques

Une gamme des galeries biochimiques ont été utilisées pour la confirmation de l'identification des souches bactériennes et fongiques. Le (tableau 6) ci-dessous résume les différentes techniques utilisées :

Tableau 6: Techniques des galeries biochimique utilisées pour l'identification des bactéries et des levures

Le type de la galerie	principe	Mode opératoire	Lecture
API Staph : utilisée pour l'identification des germes <i>Staphylococcus</i> , <i>Micrococcus</i> et <i>Kocuria</i> .	Cette galerie comporte 20 microtubes contenant des substances déshydratées. Les virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs produits pendant une période d'inoculation.	Préparation de la galerie : les alvéoles ont été remplis par l'eau distillée pour la création d'une atmosphère humide. Préparation de l'inoculum : une culture de 18-24H a été réalisée sur le milieu PCA, après la vérification d'appartenance de la souche à la famille des <i>Micrococcaceae</i>	Après l'incubation une lecture a été faite conformément au tableau de lecture, après l'ajout d'une goutte de chacun des réactifs suivant : Test VP : VP1 et VP2, la lecture a été faite après 10min, Test NIT : NIT1 et NIT2, une lecture a été réalisée après

		<p>(morphologie, Gram,...), une suspension d'opacité <u>0.5de McFarland</u> a été réalisée.</p> <p>Inoculation de la galerie : par le remplissage des tubes de la galerie avec API Staph médium, l'ensemencement a été réalisé à l'aide d'une pipette pasteur stérile, ce dernier a été effectué seulement pour les tubes et non pas les cupules, par la suite une anaérobiose a été créée dans les tests <u>ADH</u> et <u>URE</u> par le remplissage de leur cupule de la vaseline.</p> <p>Une incubation a été faite à 30-35°C pendant 18-24H.</p>	<p>10min, Test PAL : ZYM A et ZYM B après 10min une lecture a été faite.</p> <p>Les résultats ont été reportés sur la fiche des résultats et interprété par la suite selon le logiciel d'identification API web.</p>
--	--	---	--

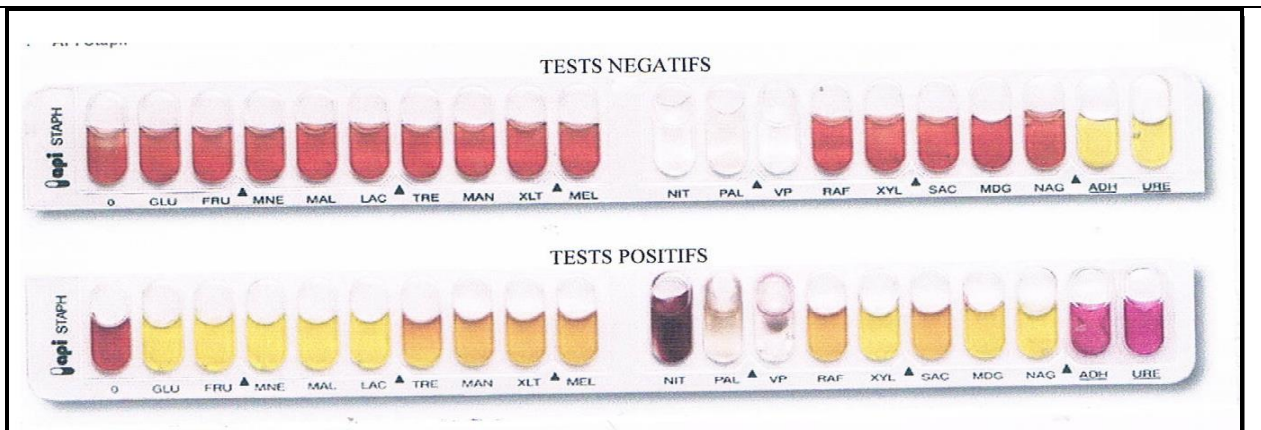


Figure 12: Résultats des tests positif et négatif de la galerie API Staph

<p>API 20 E: est un système utilisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et les autres bacilles à Gram négatif non fastidieux.</p>	<p>Cette galerie comporte 20 microtubes contenant des substances déshydratées. Les virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs produits pendant une période d'inoculation.</p>	<p>Préparation de la galerie : les alvéoles ont été remplis par l'eau distillée pour la création d'une atmosphère humide.</p> <p>Préparation de l'inoculum : une culture de 18-24H a été réalisée sur le milieu PCA, par la suite une suspension bactérienne a été réalisée à partir d'une ampoule d'API suspension medium 5ml avec une seule colonie bien isolée sur le milieu PCA.</p> <p>Inoculation de la galerie : par le remplissage des tubes de la galerie avec API 20 E, l'ensemencement a été réalisé à l'aide d'une pipette pasteur stérile, ce</p>	<p>Après l'incubation une lecture a été faite conformément au tableau de lecture, après l'ajout d'une goutte de chacun des réactifs suivant :</p> <p>Test TDA : le réactif TDA</p> <p>Test IND : le réactif JAMES.</p> <p>Test VP : VP1 et VP2, lecture après 10min.</p> <p>Les résultats ont été reportés sur la fiche des résultats et interprétés par la suite selon le logiciel d'identification API web.</p>
---	---	---	---

		<p>dernier a été effectué seulement pour les tubes et non pas les cupules, par contre un remplissage du tube et cupule a été réalisé pour les tests :</p> <p>VP</p> <p>GEL</p> <p>CIT</p> <p>Une anaérobiose a été créée dans les tests : <u>ADH</u>, <u>LDC</u>, <u>ODC</u>, <u>H₂S</u>, <u>URE</u> par le remplissage de leur cupule de la vaseline.</p> <p>Une incubation a été faite à 30-35°C pendant 18-24H.</p>	
--	--	---	--

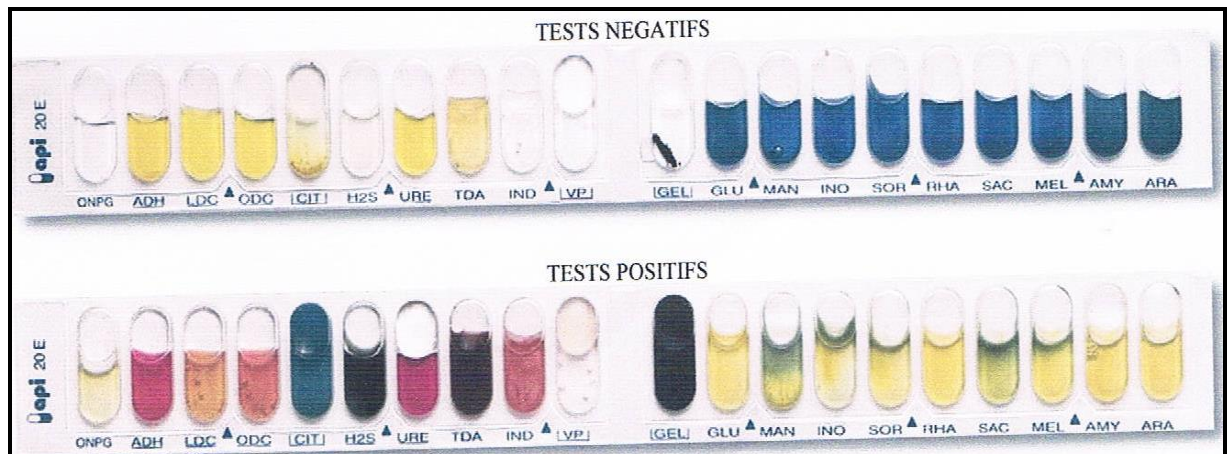


Figure 13: Tests positifs et négatifs pour la galerie API 20 E

<p>API 20 NE : utilisée pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex. <i>Pseudomonas</i>, <i>Acinetobacter</i>, <i>Flavobacterium</i>, <i>Morexella</i>, <i>Vibrio</i>, <i>Aeromonas</i>, ect). Combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation.</p>	<p>Cette galerie comporte 20 microtubes contenant des substances déshydratées. Les virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs produits pendant une période d'inoculation.</p>	<p>Préparation de la galerie : les alvéoles ont été remplit par l'eau distillée pour la création d'une atmosphère humide.</p> <p>Préparation de l'inoculum : une culture de 18-24H a été réalisée sur le milieu PCA, une suspension d'opacité égale à <u>0.5 de McFarland</u> a été faite. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.</p> <p>Inoculation de la galerie : Un remplissage des tubes des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente. Dans une autre ampoule d'API aux</p>	<p>Après l'incubation une lecture a été réalisée conformément au tableau de lecture, après l'ajout d'une goutte de chacun des réactifs suivant : Test NO₃: NIT1 et NIT2, le résultat est après 5min ; Test TRP : par le réactif JAMES. Les résultats ont été reportés sur la fiche des résultats et interprétés par la suite selon le logiciel d'identification API web.</p>
--	---	--	---

		<p>médiums un transfert d'environ 200µl a été fait pour l'inoculation des tests</p> <p>GLU à PAC</p> <p>Un remplissage de la vaseline pour les cupules des tests : <u>GLU</u>, <u>ADH</u>, et <u>URE</u>.</p> <p>Une incubation a été faite à 30-35°C pendant 24-48H.</p>	
--	--	---	--

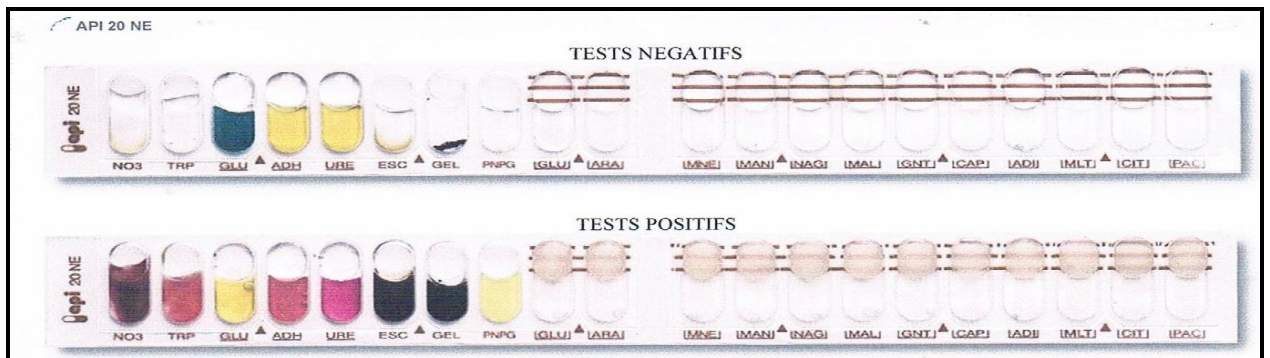


Figure 14: Résultats des tests positifs et négatifs de la galerie API 20 NE

<p>API Candida : un test pour l'identification des levures.</p>	<p>API Candida comporte 10 tubes contenant des substrats déshydratés. Les réactions produites durant l'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés.</p>	<p>Préparation de la galerie : les alvéoles ont été remplis par l'eau distillée pour la création d'une atmosphère humide.</p> <p>Préparation de l'inoculum : une suspension d'opacité <u>3de McFarland</u> a été réalisée à partir des colonies jeunes identiques et bien isolées de la levure et une ampoule d'APC NaCl 0.85% medium (2m).</p> <p>Inoculation de la galerie : l'ensemencement de la galerie a été réalisé à l'aide d'une pipette pasteur stérile, ce dernier a été effectué seulement pour les tubes et non pas les cupules, par contre un remplissage du tube et cupule a été réalisé pour les tests : (<u>GLU</u> à <u>RAF</u>) et le dernier test (<u>URE</u>).</p>	<p>Une lecture a été faite après une incubation de 24heures, Les résultats ont été notés sur la fiche des résultats ont été interprétés selon le logiciel d'identification API web.</p>
--	--	--	---

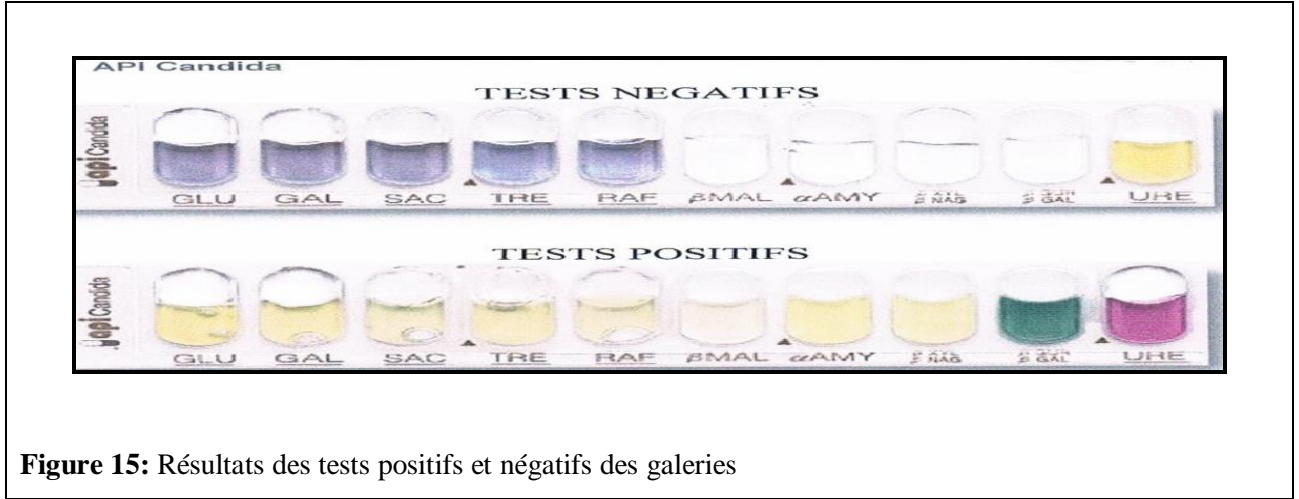


Figure 15: Résultats des tests positifs et négatifs des galeries

*Résultats et
Discussions*

4- Résultats et discussion

Le présent travail porte sur le contrôle de qualité microbiologique de l'environnement dans l'industrie pharmaceutique, au niveau de l'unité NADPHARMADIC Production.

4.1- Contrôle microbiologique

4.1.1- Contrôle de l'air

❖ Par le biocollecteur

La qualité microbiologique de l'air doit répondre aux normes de l'US Pharmacopée, dont le nombre de germes recherchés doit être inférieur ou égale à 200 UFC/ m³ représentant la classe D. Les résultats obtenus dans notre travail (tableau7) sont conformes ; respect de la norme, nombre de germes comptés est ≤ 200 UFC/m³.

Tableau 7: Nombre de germes obtenus du contrôle de l'air par le bio-collecteur

Les points de prélèvement	Le nombre de colonies sur le milieu P.C.A (UFC/m ³)	Le nombre de colonies sur le milieu Sabouraud (UFC/m ³)
Le laboratoire		
Salle de préparation	09	00
Salle d'incubation	02	00
Salle de manipulation (PSM)	09	00
Salle de la recherche des Endotoxines	00	01
La laverie	9	00
Le couloir	00	04
Le sas personnel	08	00
La production		

Salle d'enrobage	03	02
Salle de compression	01	00
Salle 1 de granulation	06	00
Salle 2 de granulation	00	05
Conditionnement primaire	06	03
Conditionnement secondaire	25	03

❖ Par les boîtes de sédimentation

Le (tableau 8) ci-dessous présente les résultats obtenus dont le nombre de germes recherchés doit être inférieur ou égale à 100 UFC/ 4 heures représentant la classe D, donc la qualité microbiologique de l'air dans notre travail est conforme selon la norme exigée.

Tableau 8: Nombre de germes obtenu du contrôle d'air par les boîtes de sédimentation

Les points de prélèvement	Le nombre de colonies sur le milieu P.C.A UFC/ 4 heures	Le nombre de colonies sur le milieu Sabouraud UFC/ 4 heures
Le laboratoire		
Salle de préparation :		
<ul style="list-style-type: none"> • Au centre de la paillasse de préparation • Devant la balance • Devant la porte • Sur la paillasse de réception des PF 	35	02
	43	01
	38	01
	23	00

Salle d'incubation :		
• Devant la porte	06	00
• Devant le compteur des colonies	01	00
• Sur le passe-plat	01	00
• Sur l'incubateur de 32.5°C	03	01
• Sur l'incubateur de 22.5°C	06	02
• Sur l'incubateur de 42.5°C	00	01
Salle de manipulation (PSM) :		
• Entrée d'air	06	00
• Sortie d'air	13	00
• Devant la porte	12	00
• Sous la hotte	00	00
• Sur le chariot du matériel	04	01
Salle de recherche des Endotoxines :		
• Sur la palliase	00	01
• Sur le réfrigérateur	01	01
La laverie :		
• Sur l'autoclave	20	00
• Devant le bain mari près du l'évier	90	00
• Devant la porte	88	03
Le couloir :		
• Coin 1 ; coté portes des salles au laboratoire	27	00
• Coin 2 ; coté portes	33	00

sas entrée et sortie du laboratoire		
Le sas personnel :		
<ul style="list-style-type: none"> • Point 1 ; derrière la porte d'entrée du laboratoire 	43	00
<ul style="list-style-type: none"> • Point 2 ; coté armoire d'échange de blouse 	42	05
<ul style="list-style-type: none"> • Point 3 ; derrière la porte de sortie du laboratoire 	90	02
<ul style="list-style-type: none"> • Point 4 ; coin en face de la porte d'entrée 	70	00
La production		
Salle d'enrobage :		
<ul style="list-style-type: none"> • Sur équipement 	05	00
<ul style="list-style-type: none"> • La grille de soufflage d'air 1 	08	00
<ul style="list-style-type: none"> • Au centre de la salle 	17	03
<ul style="list-style-type: none"> • Devant la porte 	10	01
<ul style="list-style-type: none"> • En face de la reprise d'air 	12	04
<ul style="list-style-type: none"> • Devant l'équipement 	18	02
<ul style="list-style-type: none"> • La grille de soufflage d'air 2 	25	02
Salle de compression :		
<ul style="list-style-type: none"> • La grille de soufflage 1 	03	00
<ul style="list-style-type: none"> • Devant l'équipement 	09	00
<ul style="list-style-type: none"> • Devant la porte 	30	01
<ul style="list-style-type: none"> • Devant la balance 	04	01
<ul style="list-style-type: none"> • Sur l'équipement 	06	00

<ul style="list-style-type: none"> • La grille de soufflage 2 	07	00
Salle 1 de granulation : <ul style="list-style-type: none"> • Au centre de la salle • Devant la porte • Reprise d'air 	00 03 00	00 00 00
Salle 2 de granulation : <ul style="list-style-type: none"> • Sur équipement • Devant la porte • Au coin près de la porte d'entrée 	00 00 03	01 00 01
Conditionnement primaire : <ul style="list-style-type: none"> • Devant la porte • Devant équipement 	89 25	03 02
Conditionnement secondaire : <ul style="list-style-type: none"> • Devant la porte 	47	03

4.1.2 - Contrôle par l'écouvillonnage

❖ Surface

La qualité microbiologique des surfaces doit répondre aux normes de l'US Pharmacopée, dont le nombre de germes recherchés doit être inférieur ou égale à 50 UFC/ Boite représentant la classe D. Les résultats obtenus lors prélèvement sont récapitulés dans les (tableaux 9) ci-dessous, sont à l'intervalle des normes donc respect de la norme, nombre de germes comptés est ≤ 50 UFC/ Boite

Tableau 9: Nombre de germes dans surfaces contrôlées

Les points de prélèvement	Le nombre de colonies sur le milieu P.C.A UFC/Boite	Le nombre de colonies sur le milieu Sabouraud UFC/Boite
Le laboratoire		
Salle préparation :		

<ul style="list-style-type: none"> • Palliasse 1 	36	00
<ul style="list-style-type: none"> • Palliasse 2 	15	04
Salle incubation		
<ul style="list-style-type: none"> • Palliasse 	17	02
Salle de manipulation PSM :		
<ul style="list-style-type: none"> • Sous la hotte 	00	00
Salle recherche des endotoxines :		
<ul style="list-style-type: none"> • Palliasse 	05	01
La laverie :		
<ul style="list-style-type: none"> • Palliasse 	41	03
La production		
Compression :		
<ul style="list-style-type: none"> • Equipement 	02	00
<ul style="list-style-type: none"> • Panneau 	05	00
<ul style="list-style-type: none"> • Sol 	01	02
<ul style="list-style-type: none"> • Porte 	10	01
Enrobage :		
<ul style="list-style-type: none"> • Panneau 	00	00
<ul style="list-style-type: none"> • Equipement 	01	00
<ul style="list-style-type: none"> • Sol 	02	01
Granulation :		
<ul style="list-style-type: none"> • Panneau 	03	00
<ul style="list-style-type: none"> • Equipement 	01	01
<ul style="list-style-type: none"> • Sol 	50	01
Conditionnement primaire :		
<ul style="list-style-type: none"> • Equipement 	60	05
<ul style="list-style-type: none"> • Sol 	75	02
<ul style="list-style-type: none"> • panneau 	45	02
Conditionnement secondaire :		
<ul style="list-style-type: none"> • Equipement 	00	00

• Sol	43	02
• Panneau	53	05

❖ Habillage :

L'US Pharmacopée indique que les résultats obtenus répondent aux normes, dont le nombre de germes recherchés doit être inférieur ou égale à 50 UFC/ Boite représentant classe D avec Les résultats obtenus lors du prélèvement sont récapitulés dans le (tableau 10) ci-dessous.

Tableau 10: Nombre d'isolat dans l'habillage du personnel

Les points de prélèvement	Le nombre de colonies sur le milieu P.C.A UFC/Boite	Le nombre de colonies sur le milieu Sabouraud UFC/Boite
Le laboratoire		
Personne 1 :		
• Le coude	00	00
• Le poignet	00	00
• L'abdomen	00	00
Personne 2 :		
• Le coude	00	00
• Le poignet	01	00
• L'abdomen	13	04
Personne 3 :		
• Le coude	05	02
• Le poignet	04	01
• L'abdomen	05	03
La production		
Enrobage opérateur 1 :		
• Le coude	10	02
• Le poignet	01	00
• L'abdomen	00	00
Granulation opérateur 1 :		

<ul style="list-style-type: none"> • Le coude • Le poignet • L'abdomen 	<p>15</p> <p>00</p> <p>02</p>	<p>02</p> <p>01</p> <p>01</p>
Granulation opérateur 2 : <ul style="list-style-type: none"> • Le coude • Le poignet • L'abdomen 	<p>02</p> <p>00</p> <p>01</p>	<p>00</p> <p>02</p> <p>01</p>
Compression opérateur 1 : <ul style="list-style-type: none"> • Le coude • Le poignet • L'abdomen 	<p>14</p> <p>00</p> <p>01</p>	<p>00</p> <p>00</p> <p>00</p>
Conditionnement primaire Opérateur1 : <ul style="list-style-type: none"> • Le coude • Le poignet • L'abdomen 	<p>09</p> <p>17</p> <p>03</p>	<p>02</p> <p>04</p> <p>01</p>
Opérateur 2 : <ul style="list-style-type: none"> • Le coude • Le poignet • L'abdomen 	<p>04</p> <p>06</p> <p>09</p>	<p>01</p> <p>00</p> <p>00</p>
Opérateur 3 : <ul style="list-style-type: none"> • Le coude • Le poignet • L'abdomen 	<p>07</p> <p>07</p> <p>10</p>	<p>02</p> <p>00</p> <p>01</p>

4.1.3 - Contrôle des empreintes

Selon USP le nombre de germes par gant ne doit pas dépasser 10 UFC/ gant, pour cela le nombre de germe obtenu répond aux exigences, mais il y a la présence des germes pathogènes, donc les résultats ne sont pas conformes. Ces derniers sont récapitulés dans le (tableau 11) ci-dessous.

Tableau 11: Nombre de germes obtenus du contrôle des empreintes

Le point de prélèvement	Le nombre de colonies sur le milieu P.C.A UFC/gant	Le nombre de colonies sur le milieu Sabouraud UFC/gant
Opérateur compression : <ul style="list-style-type: none"> • Main gauche • Main droite 	02 04	01 00
Opérateur 1 granulation : <ul style="list-style-type: none"> • Main gauche • Main droite 	03 03	00 00
Opérateur 2 granulation : <ul style="list-style-type: none"> • Main gauche • Main droite 	02 03	00 02
Opérateur enrobage : <ul style="list-style-type: none"> • Main gauche • Main droite 	03 03	04 03
Opérateur 1 conditionnement primaire : <ul style="list-style-type: none"> • Main gauche • Main droite 	06 03	02 04
Opérateur 2 conditionnement primaire : <ul style="list-style-type: none"> • Main gauche • Main droite 	09	03
Opérateur 3 conditionnement primaire : <ul style="list-style-type: none"> • Main gauche • Main droite 	02 04 06	05 04 02

4.1.4 - Contrôle de L'eau de rinçage :

La qualité microbiologique de l'eau purifiée doit répondre aux normes de la Pharmacopée européenne, dont le nombre de germes recherchés doit être ≤ 100 UFC/ mL, donc notre analyse montre que l'eau est conforme. Les résultats obtenus lors du prélèvement sont récapitulés dans le (tableau 12) ci-dessous.

Tableau 12 : Résultats d'isolement des microorganismes du l'eau de rinçage


Les points de prélèvement	Le nombre de colonies sur le milieu R2A UFC/ml
La vanne VD POU 016 au niveau du laboratoire	07
La vanne VD POU 013 AU de la laverie de la production	66

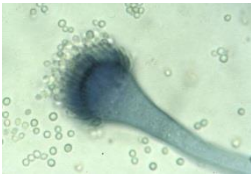
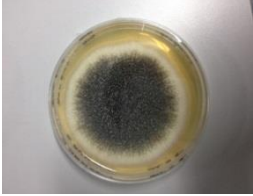
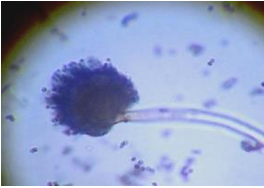
4.2- Purification et identification des isolats obtenus:


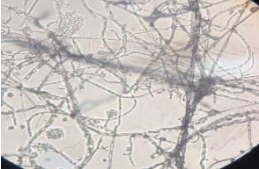

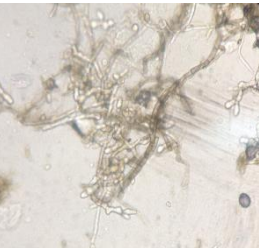
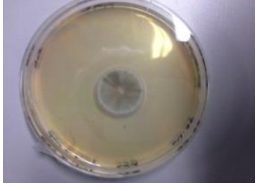
4.2.1- Moisissure :

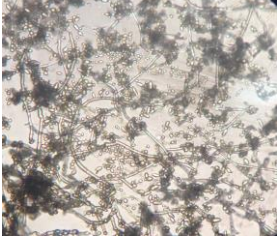


Les caractères macroscopiques et microscopiques de différentes souches sélectionnées sont étudiés sur le milieu SAB le plus communément utilisé à cet effet (Botton, 1990). Le (tableau 13) ci-dessous résume l'aspect macroscopique et microscopique du mycélium, la surface, la consistance des colonies, la couleur du revers..., et cela pour les souches isolées à partir de l'air, les surfaces, l'habillage, les empreintes et l'eau purifiée.

Tableau 13: Les caractéristiques macroscopiques et microscopiques des souches fongiques

Numéro d'isolat	Observations macro-microscopiques	Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques	Nom taxonomique
1		Croissance rapide, velouté, couleur verte franche puis grisâtre avec le temps,	Mycélium cloisonnés. Tête conidienne en colonne lâche. Conidies cylindriques au	<i>Aspergillus fumigatus</i>

		Revers incolore à jaune.	départ.	
2	 	Colonies noires ; Croissance rapide ; Floconneuse ; Revers blanc.	Mycélium cloisonnée. Les spores sont produites en chainettes, à l'extrémité d'une phialide non renflée, porte éventuellement par une métule. Différent métules sont rassemblées sur un conidiophore renflé.	<i>Aspergillus niger</i>
		Texture floconneuse ; avec variation	Filament septé, des microconidies	<i>Microsporum sp</i>

<p>3</p>	 	<p>de couleur en fonction du temps blanche, rose et jaune pour les extrémités. Vitesse de croissance rapide ; Revers blanc, rose, et jaune.</p>	<p>nombreuses et arrondies</p>	
<p>4</p>	 	<p>Petites colonies, veloutées, poudreux par, vert-olive Revers noir à reflets verts.</p>	<p>Conidiophores : naissent en position latérale ou quelquefois terminale sur l'hyphe couleur brun. Paroi lisse.</p>	<p><i>Cladosporium sp</i></p>
<p>5</p>		<p>Thalle plus ou moins hyalin devenant blanc et vert en vieillissant Revers incolore.</p>	<p>Conidiophores ramifiés suivant une structure pyramidale,</p>	<p><i>Trichoderma sp</i></p>

				
6	 	<p>Colonies veloutées à poudreuses de couleur vert ; Revers noir.</p>	<p>Mycélium septé. pinceau (conidiophore, ramifié ou non portant des métules sur lesquelles se placent des bouquets de phialides productrices de longues chainette de spores rondes.</p>	<p><i>Penicillium sp</i></p>

4.2.2- Bactéries et levures :

❖ *Observation macroscopique :*

L'observation macroscopique a permis de mettre en évidence l'aspect des colonies. Ces observations montrent une grande diversité des caractères morphologiques des souches les plus réponsus, que ce soit bactéries (tableau 14) ou levures (tableau 15), isolées à partir de l'air, les surfaces, l'habillage, les empreintes et l'eau purifiée. Diversité se voit aux différents niveaux suivant : la taille, la forme, le relief et la couleur.

❖ *Observation microscopique :*

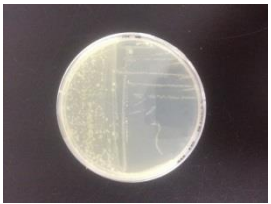
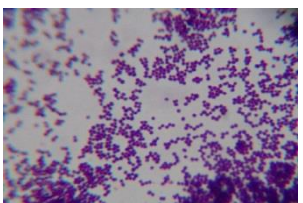


➤ *L'état frais*




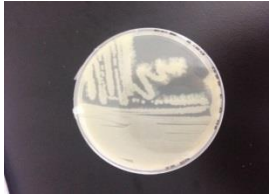
La réalisation de l'état frais nous a permis d'observer la morphologie des bactéries et des levures, de voir si elles sont de type mobile ou immobile (Camille, 2007). Les résultats obtenus montrent que certains isolats sont mobiles, d'autres sont immobiles (tableau 14).

➤ *Coloration de Gram*

Après avoir effectué une coloration de Gram sur les dix souches bactériennes, une couleur violette signifie le type Gram + et une couleur rose signifie le type Gram - (Camille, 2007), aperçus sous microscope électronique (tableau 14) et pour les levures (tableau 15).

Tableau 14: Les souches bactériennes du laboratoire, la production et l'eau purifiée.

Numéro d'isolat	Observation macro-microscopique	Caractères macroscopique	Caractères microscopique
1	 	Colonies lisses, rondes, bombées, pigmentées en jaune.	<p>À l'état frais : immobiles, non sporulées</p> <p>Coloration de Gram : Cocci GRAM+, en amas.</p>
2	 	Colonies bombées, odeur caractéristique.	<p>À l'état frais : mobile, non sporulées,</p> <p>Coloration de Gram : Bacille GRAM-</p>

<p>3</p>		<p>Des colonies rondes, bombées, aspect plus ou moins muqueux.</p>	<p>À l'état frais : Immobiles. Coloration de Gram : Bacilles GRAM-</p>
<p>4</p>		<p>Des colonies lisses, rondes, pigmenté en beige.</p>	<p>À l'état frais : mobile Coloration de Gram : Bacille GRAM-, long</p>
<p>5</p>		<p>Des petites colonies, rondes, opaques, bombées, crémeuses, lisses et brillante, pigmenté (pigment jaunes)</p>	<p>À l'état frais : immobile, non sporulé. Coloration de Gram : Cocci GRAM+ en amas</p>
<p>6</p>		<p>Des colonies lisses, de couleur beige</p>	<p>À l'état frais : mobile Coloration de Gram : Bacille GRAM-</p>

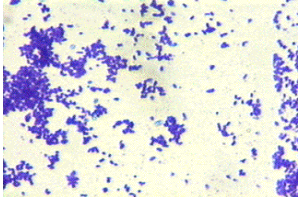

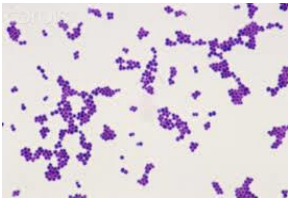

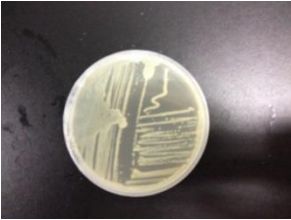
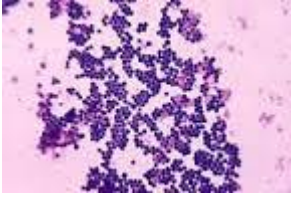
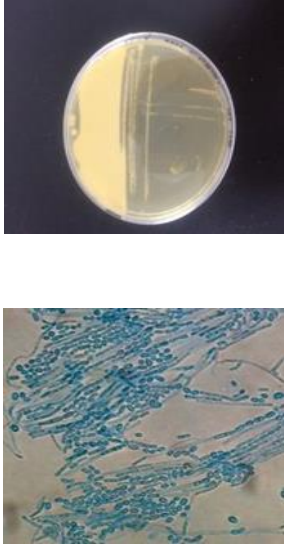
			
7	 	<p>Colonies lisses, rondes, bombées, pouvant être pigmenté en jaune orangé.</p>	<p>À l'état frais : immobile, non sporulé. Coloration de Gram : Cocci GRAM+, en amas</p>
8		<p>Des colonies rondes lisses par fois muqueuses</p>	<p>À l'état frais : cellules immobiles Coloration de gram : Coccobacilles GRAM-</p>
9	 	<p>Des colonies rondes lisses de couleur doré.</p>	<p>A l'état frais : Cellules non mobiles Coloration de gram : Cocci GRAM+ En amas ; grappe de raisin</p>

Tableau 15 : Les souches levuriennes, aspects observation macroscopique et microscopique

Numéro d'isolat	Observations macro-microscopiques	Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques
1		Colonies blanches, plissées, et brillantes	Présence du pseudomycélium et de vrais filaments, arthospores bourgeonnantes

❖ *Tests biochimiques*

Les résultats obtenus de l'identification des bactéries et des levures par les galeries API sont présents dans les tableaux ci-dessous (tableau 14) pour les bactéries, et (tableau 15) pour les levures.

Tableau 16 : Identification des bactéries par les galeries API

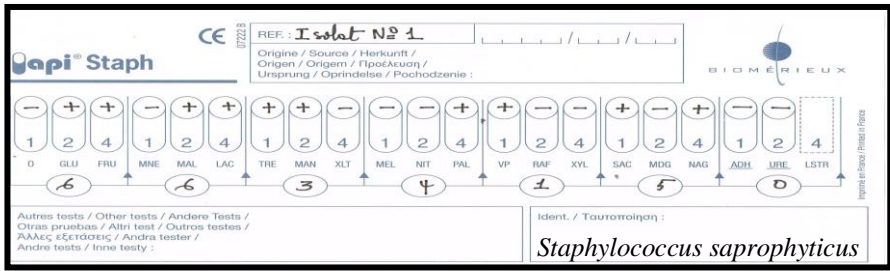
Numéro d'isolat	La galerie
1	 <p>Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλα εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy :</p> <p>Ident. / Ταυτοποίηση : <i>Staphylococcus saprophyticus</i></p>

Figure 16 : Profil de l'isolat n°1 de la galerie API Staph

4

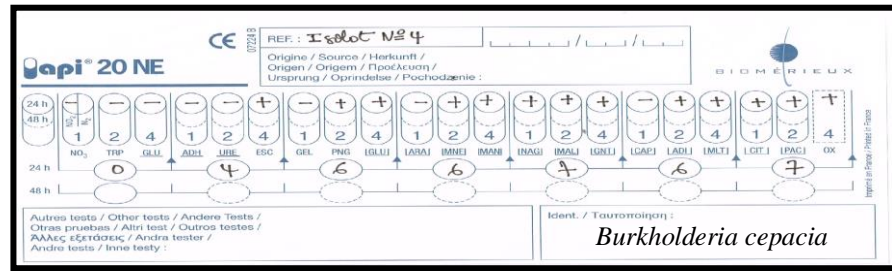


Figure 21: Profil numérique de l'isolat n°4 de la galerie API 20NE

5

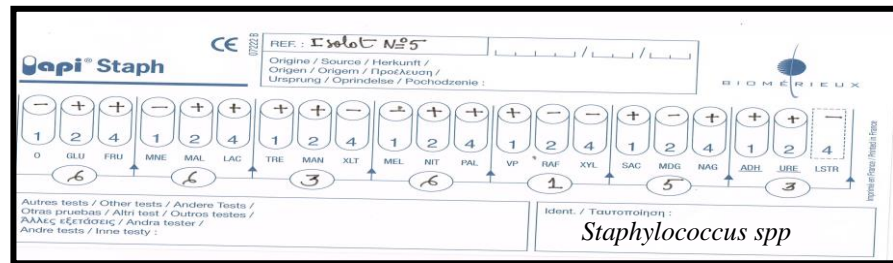


Figure 22: Profil numérique de l'isolat n°5 de la galerie API Staph



Figure 23: Galerie API Staph pour l'isolat n°5

6

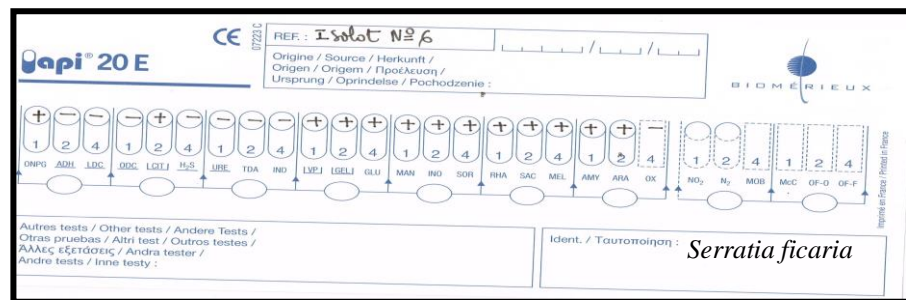


Figure 24: Profil numérique de l'isolat n°6 de la galerie API 20 E

6



Figure 25: Galerie API 20 E de l'isolat n°6

7

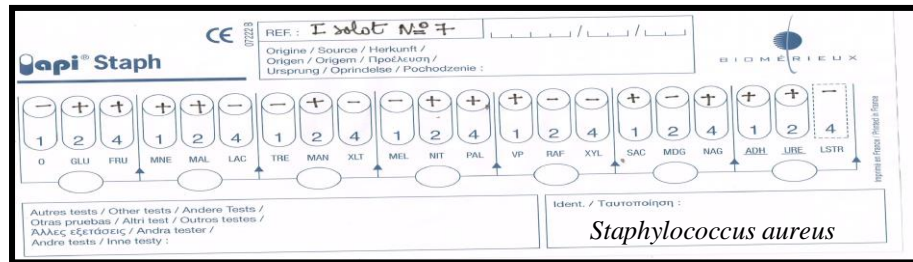


Figure 26: Profil numérique de l'isolat n°7



Figure 27: Galerie API Staph de l'isolat n°7

8

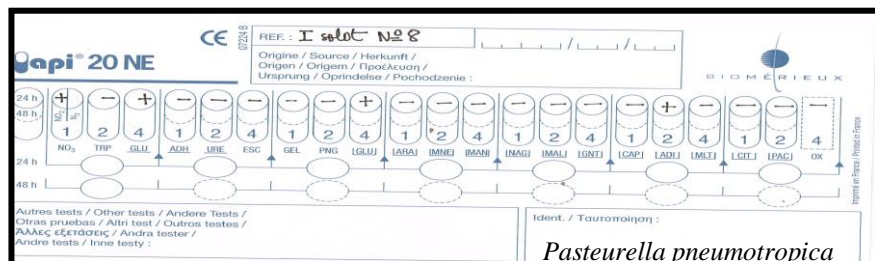


Figure 28: Profil numérique de l'isolat n°8

Les résultats des divers contrôles de l'environnement effectués sur les points critiques dans l'industrie pharmaceutique sont **conformes** aux normes selon les dénombrements obtenus (USP et BPF), néanmoins après identification des microorganismes présents on a trouvé quelques germes pathogènes tels que : *S. aureus* et *Pseudomonas*.

Pour cela, ces microorganismes doivent être éliminés par des méthodes plus rigoureuses de nettoyage et de désinfection.

À la fin, on peut déduire qu'il y a un risque de contamination d'environnement au niveau de l'entreprise qui a fait l'objet de notre travail, même si des contrôles microbiologiques pour toutes les matières premières et produits finis fabriqués au niveau de la production sont effectuées au quotidien et n'ont jamais soulevé un problème de contamination. La charge microbienne n'influence pas sur la qualité microbiologique des produits.

Conclusion

5- Conclusion

Des souches bactériennes, fongiques et levuriennes ont été isolées à partir des différents points du laboratoire de contrôle qualité (département de la microbiologie) et de la zone de fabrication (salle de granulation, d'enrobage et de compression), conditionnement (conditionnement primaire et secondaire). L'identification des isolats a été réalisée pour toutes les souches : 1 souche levurienne, 6 fongiques et 9 bactériennes.

Les résultats montrent que la souche levurienne obtenue appartient au genre *Trichosporon* et ce, selon les critères d'identification propres à Lodder (1971), Kreger Van (1984) et Guiraud (1998) d'une part et d'autre part les critères propres à Botton (1990) montrent que les souches fongiques appartiennent aux genres, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Microsporium*. En effet, L'identification des souches bactériennes basée sur l'étude microscopique (état frais, coloration de Gram,) et l'étude biochimique par l'utilisation des API : API Staph, API 20 E, API 20 NE ont montré que les 9 isolats bactériens obtenus appartiennent au genre *Staphylococcus* *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Pasteurella* et ce, selon les critères d'identification propres à Guiraud (1998). On peut conclure que l'environnement de l'industrie est propre et conforme aux normes prescrites dans l'US pharmacopée 34-2011, et les BPF.

Après l'achèvement de ce travail, nous pouvons dire avoir eu connaissance (pratique, analyse et identification) des techniques suivantes :

- ❖ Étude microscopique des levures et bactéries (état frais, coloration de Gram).
- ❖ Étude microscopique des moisissures.
- ❖ Les tests biochimiques par l'utilisation des galeries API pour bactéries et les levures.

De ce fait, au terme de cette recherche nous pouvons fixer les points suivants comme recommandations :

- Optimisation de procédé de nettoyage (utilisation des détergents et des désinfectants plus efficaces pour l'élimination complète des contaminants) ;
- Éviter les plis au niveau des blouses et des tenues de production, pouvant être une source de contamination ;
- Les opérateurs de production doivent changer les gants fréquemment et faire des frictions hydro-alcoolique ;
- Réaliser, si possible, une fumigation après le nettoyage au niveau du laboratoire et les différentes sections de la production.

Résumé

Sur la base des résultats obtenus lors du contrôle microbiologique de l'environnement dans l'industrie pharmaceutique NADPHARMADIC Production de Constantine, à partir du laboratoire de contrôle qualité (département de la microbiologie) et de la zone de fabrication (salle de granulation, d'enrobage et de compression), conditionnement (conditionnement primaire et secondaire). L'identification des isolats a été réalisée pour toutes les souches.

De ce fait, 01 souche levurienne, 06 souches fongiques, et 09 souches bactériennes ont été isolées.

Les résultats montrent que la souche levurienne obtenue appartient au genre *Trichosporon*, et les souches fongiques appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Microsporum*, ainsi que les souches bactériennes appartiennent aux genres *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Pasteurella*.

Abstract

The results obtained in the microbiological control of the environment in the pharmaceutical industry NADPHARMADIC Production Constantine, from the quality control laboratory (department of microbiology) and manufacturing zone (granulation hall of coating and compression), packaging (primary and secondary packaging). Identification of the isolates was carried out for all strains.

Therefore, 01 yeast strain, 06 fungal strains, and 09 bacterial strains were isolated.

The results show that the yeast strain obtained belongs to the genus *Trichosporon*, the fungal strains belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Microsporum* and the bacterial strains belong to the genera *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Brukholderia*, *Serratia*, *Pasteurella*.

ملخص

تحصلنا على نتائج من خلال المراقبة الميكروبيولوجية لمحيط مصنع الأدوية NADPHARMADIC Production de Constantine , و بتحديد في مخبر مراقبة النوعية قسم الميكروبيولوجيا و منطقة الإنتاج(قاعة التحبيب, قاعة التغليف, و قاعة الكبس), التجهيز الأولي و التجهيز الثانوي.

حيث بينت الدراسة أنه تم التعريف بجميع المستعمرات التي تم عزلها.

و لهذا 01 سلالة خميرة, 6 سلالات فطرية, و 9 سلالات بكتيرية تم عزلها.

النتائج توضح أن سلالة الخميرة تنتمي إلى النوع *Trichosporon*, و أن السلالات الفطرية تنتمي إلى الأنواع التالية: *Penicillium, Trichoderma, Aspergillus, Microsporum* و كذلك السلالات البكتيرية تعود إلى الأنواع التالية: *Staphylococcus, Cladosporium, Pseudomonas, Klebsiella, Burkholderia, Serratia, Pasteurella*

الكلمات المفتاحية: مراقبة ميكروبيولوجية, *Aspergillus sp, Staphylococcus*.

Référence
Bibliographique

- 1- BADILLET G ; de BRIEVE C ; GUEHO E; *Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes*. Atlas clinique et biologique, vol II, Ed VARIA, Paris 1987.
- 2- Botton B ; Breton A ; Fevre M ; Gauthier S ; Guy Ph ; Larpent J.p ; Reymond P ; Sanglier J.J ; Vayssier Y ; et Veau P ; *Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle*. (edn) MASSON, Paris 1990.
- 3- BOYSEN M.E; Jacobsson K.G; Schnürer J; *Molecular Identification of Species from the Penicillium roqueforti Group Associated with Spoiled Animal Feed*, Appl. Environ. Microbiol., 66 (4), 1523-1526
- 4- BPF, 2011 Bonne pratiques de fabrication, LD.1. Fabrication des médicaments stériles. [ed.] Bulletin Officiel. 2011. Vol. 8bis.
- 5- CAHAGNIER B ; Richard-Molard D ; Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés, Ed. Tec & Doc, p 140-158, 1998.
- 6- CAMILLE, Delarras. *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. TEC ET DOC éd. Paris ; TEC DOC, 2007.
- 7- CAMPBELL C.K; Johnson E.M; Philpot C.M; Warnock D.W; *Identification of pathogenic fungi*, Public Health Laboratory Service.
- 8- CHABASSE, Dominique ; BOUCHRA, Jean-philippe ; DEGENTIL, Ludovie ; *et al*. Cahier de formation biologie médicale ; les moisissures d'intérêt médical N°25.
- 9- De Aguirre L; Hurst S.F; Choi J.S; Shi n J.H; Hinrikson H.P; Morrison C.J; (2004) *Rapid Differentiation of Aspergillus Species from Other Medically Important Opportunistic Molds and Yeasts by PCR-Enzyme Immunoassay*, J. Clin. Microbiol., 42 (8), 3495-3504
- 10- De HOOG G.S., Guarro J., (1995), Atlas of clinical fungi, Centraalbureau voor Schimmel cultures, Baarn, Pays-Bas
- 11- DAIL S.M; (2007), Fungal diagnostics: current techniques and future trends, Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract., 37(2):373-92
- 12- Ernt T. Rietschel, 1994, Bacterial endotoxin : *Molecular relationship of structure to activity and function*, Eenstt T; Teruo kirikae, F. Ulrich Schade, Uwe Mamat, Guner Schmidt, Harald Loppnow, Artur J. Ulmer, Ulrich Seydel, Franco Di Padova, Max SHRERIER, Helmut Bradz, The FASEB Journal, Vol.8, Février 1994.
- 13- FEUILHADE de Chauvin M ; (2005), New diagnostic techniques, J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. , 19 (1), 20-24

- 14- GUARRO J; Gene J; (1992), *Fusarium infections, Criteria for the identification of the responsible species*, Mycoses, 35, 109-114
- 15- GUIRAUD, Joseph Pierre Microbiologie alimentaires. Dunod éd. Paris; Dunod, 1998. ISBN: 2100036661.
- 16- HAGESKALG; Knutsen A .K; Gaustad P; de Hoog G; Skaar I; (2006), Diversity and Significance of Mold Species in Norwegian Drinking Water, Appl. Environ. Microbiol; 72 (12), 7586-7593
- 17- HEALY M; Reece K; Walton D; Huong J; Frye S., Raad II, Kontoyiannis D.P., (2005), Use of the DiversiLab System for Species and Strain Differentiation of Fusarium Species Isolates, J. Clin. Microbiol., 43 (10), 5278-5280
- 18- HINRIKSON H.P; Hurst S.F; De Aguirre L; Morrison C.J; (2005), *Molecular methods for the identification of Aspergillus species*, 43 (1), 129-137.
- 19- ISO 14644-2, 2000, AFNOR, Salles propres et environnements maîtrisés, Partie 2 Spécifications pour les essais et la surveillance en vue démontrer le maintien de la conformité avec l'ISO 14644-1.
- 20- JIN J; Lee Y.K; Wickes B.L; (2004), *NOTES Simple Chemical Extraction Method for DNA Isolation from Aspergillus fumigatus and Other Aspergillus Species*, J. Clin. Microbiol., 42 (9), 4293-4296
- 21- JOHNSON M.J; THATCHER E. Et COX M.E. Techniques for controlling variability in gram staining of obligate anaerobes. J Clin Microbiol. (1995) 33(3): 755-758.
- 22- LODDER J. The yeast, a taxonomic study. 2ème éd. North Holland, Amsterdam, Londres. 1971. 1385p.
- 23- PETERSON S.W; (2006), Multilocus sequence analysis of Penicillium and Europenicillium species, Rev. Iberoam Micol; 23(3), 134-8.
- 24- REISS E; Tanaka K; Bruker G; Chazalet V ; Coleman D ; Debeaupuis J .P; Hanazawa R; Latgé J.P; Lortholary J; Makimura K; Morrison C.J; Murayama S.Y; Naoe S; Paris S; Sarfati J; Shibuya K; Sullivan D; Uchida K; Yamaguchi H; (1998), Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections, 36 (1), 249-257
- 25- ROMAN, S. *Pourquoi valider et comment valider?* - STP Pharma Pratiques 7(5),332-338, 1997
- 26- SCHABEREITER-GURTNER C; Selitsch B ; Rotter M .L; Hirschl A .M ; Willinger B ; (2007), Development of Novel Real-Time PCR Assays for Detection and Differentiation of Eleven Medically Important Aspergillus and Candida Species in Clinical Specimens, J. Clin. Microbiol., 45 (3), 906-914

- 27- SINGLONTON, P. Bactériologie pour la médecine; la biologie et les biotechnologies. 6ème éd. Paris; Dunod, 2005.
- 28- TALBERT, Mark; WILLOQUET, Gérard. Guide de pharmacopée. 5eme éd. Paris ; Canada, 2003.
- 29- TORTORA, J., FUNK, B.F., CASE, CH.L. Introduction à la microbiologie. Canada, 2003.
- 30- US FDA, 2004, Good Manufacturing Practices for products: main principals, Technical Report Series, No. 961.

Annexe

Annexe 1**Milieux de culture****• Eau physiologique**

NaCl.....	9g
Eau distillée.....	1000ml

• STANDARD METHODE AGAR (P.C.A)

Enzymatic digest of casein.....	5g
Yeast extract	2.5g
Glucose (anhydrous).....	1.0g
Bacteriologica.....	15.0g
Eau purifiée.....	1000ml

• SABOURAUD

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

Le pH = 5.6 ± 0.2 à 25°C

• R2A

Proteose Peptone	0.5g/L
Strach	0.5g/L
Glucose	0.5g/L

Yeast Extract	0.5g/L
Casein Hydrolysate.....	0.5g/L
Dipotassium Phosphate.....	0.3g/l
Sodium pyruvate.....	0.3g/L
Magnesium Sulfate Anhydrous Bacteriological Agar.....	15g/L

Le pH = 7.2 ± 0.2 à 25°C

- **Milieu gélifié aux peptones de caséine et de soja (T.S.A)**

Peptone pancréatique de caséine.....	15.0g/l
Peptone papaique de soja.....	5.0g/l
Chlorure de sodium.....	5g/l
Gélose	15.0g/l
Eau purifiée.....	1000ml

Le pH = 7.3 ± 0.2 à 25°C

Annexe 2

Les réactifs et les colorants

- **Réactif de Kovacs**

Diméthyle-amino-4-benzaldéhyde.....	50g
Acide chlorhydrique pur.....	250ml
Pentanol qsp.....	1000ml

- **Voges proskauer**

VP1 (5ml) : hydroxyde de potassium.....	40g
Eau distillée	100ml
VP2 (5ml): α -naphtol.....	6g
Ethanol.....	100ml

- **Colorant Lactophénol**

Bleu de méthyle (bleu cotton).....	0.1g
Eau bidistillée.....	20ml
Acide lactique.....	20g
Glycérol.....	40g
Phénol.....	20g

Annexe 3

Fiche technique du biocollecteur

PRINCIPE du bio-collecteur :

Le bio-collecteur aspire l'air à une vitesse fixe pour un temps variable à travers les trous qui se trouvent au niveau de sa couverture.

Le flux laminaire d'air résultant est dirigé vers la surface de la gélose dans la boîte de pétri, cette dernière contient un milieu compatible avec l'examen microbiologique à réaliser.


Lorsque le cycle d'échantillonnage prédéfini est terminé, on enlève la boîte et on l'incube, à la fin on peut compter les microorganismes pour une évaluation du niveau de contamination.



Annexe 4

Les galeries

apiweb™ - Résultat d'identification http://localhost/servlet/Identif



API STAPH V4.1

-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
O	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR
↑	6	↑	6	↑	3	↑	4	↑	1	↑	5	↑	0	↑						↑

REFERENCE DATE
25/05/15

COMMENTAIRE

BONNE IDENTIFICATION

Galerie API STAPH V4.1
Profil 6 6 3 4 1 5 0
Note(s)

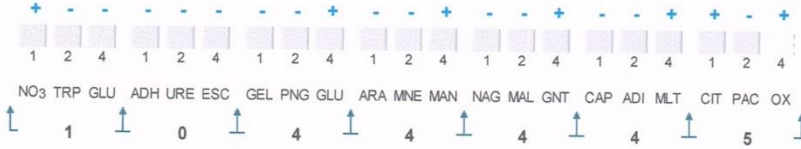
Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Staphylococcus saprophyticus	90.9	0.83	PAL 14%
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Staphylococcus sciuri	2.9	0.54	MNE 99% NIT 83%

[Fermer](#)
[Imprimer](#)

sur 1 25/05/2015 17:06



API 20 NE V7.0



REFERENCE	DATE
	27/05/15
COMMENTAIRE	

BONNE IDENTIFICATION

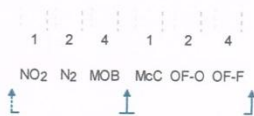
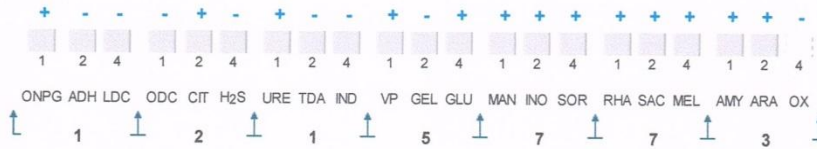
Galerie	API 20 NE V7.0
Profil	1 0 4 4 4 5
Note(s)	ID.NON VALIDE AVANT 48 H D'INCUBATION !

Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	94.0	0.79	MALa 75% CAPa 87%
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre
<i>Ralstonia pickettii</i>	5.1	0.63	MANa 10% CAPa 86%

[Fermer](#)
[Imprimer](#)



API 20 E V4.1



REFERENCE DATE
 25/05/15

COMMENTAIRE

BONNE IDENTIFICATION

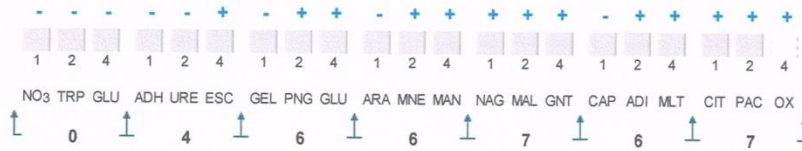
Galerie API 20 E V4.1
 Profil 1 2 1 5 7 7 3
 Note(s) POSSIBILITE DE Raoutella planticola

Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	98.0	0.93	
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Klebsiella oxytoca	1.4	0.62	LDC 80% IND 99%
Test(s) complémentaire(s)	5KG	RM	
Raoutella planticola	98%	100%	
Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	2%	9%	

[Fermer](#)
[Imprimer](#)



API 20 NE V7.0



REFERENCE DATE
 COMMENTAIRE 31/05/15

BONNE IDENTIFICATION

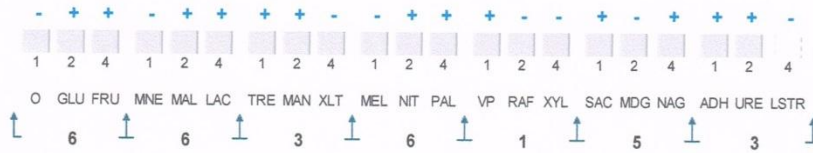
Galerie API 20 NE V7.0
 Profil 0 4 6 6 7 6 7
 Note(s) POSSIBILITE DE Burkholderia gladioli

Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Burkholderia cepacia	98.6	0.39	ARAa 75% MALa 8% CAPa 99%
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Sphingomonas paucimobilis	1.3	0.13	ARAa 83% MANa 15% ADIa 3% PACa 1%
Test(s) complémentaire(s)	CELac		SACCHAROSE
Burkholderia cepacia	+		+
Burkholderia gladioli	-		-

[Fermer](#)
[Imprimer](#)



API STAPH V4.1



REFERENCE DATE
25/05/15

COMMENTAIRE

BONNE IDENTIFICATION AU GENRE

Galerie API STAPH V4.1
Profil 6 6 3 6 1 5 3
Note(s) POSSIBILITE DE S.intermedius SI VETERINAIRE

Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Staphylococcus aureus	65.9	0.8	MNE 95%
Staphylococcus saprophyticus	15.3	0.76	PAL 14%
Staphylococcus simulans	8.9	0.72	MAL 11%
Staphylococcus hominis	8.7	0.84	

Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Staphylococcus warneri	0.4	0.49	LAC 19% NIT 23% PAL 16% NAG 6%

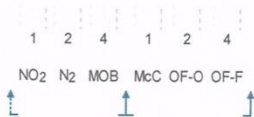
Test(s) complémentaire(s)	COAGULASE	DNase Th	TURANOSEac	NOVO R
Staphylococcus aureus	+	+	+(-)	-
Staphylococcus hominis	-	-	+	-
Staphylococcus intermedius	+	+	-	-
Staphylococcus saprophyticus	-	-	+(-)	+
Staphylococcus simulans	-	-	-	-

🔒 Fermer

🖨️ Imprimer



API 20 E V4.1



REFERENCE	DATE
	25/05/15
COMMENTAIRE	

BONNE IDENTIFICATION

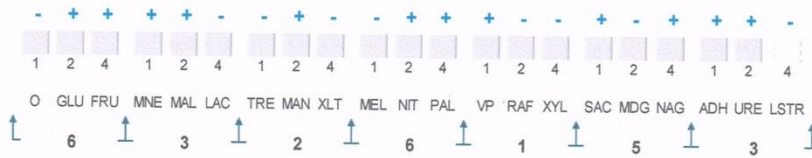
Galerie	API 20 E V4.1
Profil	12 07773
Note(s)	

Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Serratia ficaria	97.3	0.97	
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Pantoea spp 2	1.8	0.72	GEL 4%

[Fermer](#)
[Imprimer](#)



API STAPH V4.1



REFERENCE

DATE

25/05/15

COMMENTAIRE

BONNE IDENTIFICATION

Galerie

API STAPH V4.1

Profil

6 3 2 6 1 5 3

Note(s)

POSSIBILITE DE S.intermedius SI VETERINAIRE

Taxons significatif(s)

Staphylococcus aureus

% ID

92.0

T

0.7

Test(s) à l'encontre

LAC 88% TRE 91%

Taxon suivant

Staphylococcus hominis

% ID

5.7

T

0.69

Test(s) à l'encontre

TRE 86%

Test(s) complémentaire(s)

Staphylococcus aureus

JAUNE

+(-)

TURANOSEac

+(-)

Staphylococcus intermedius

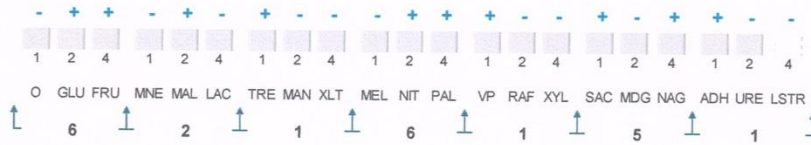
-

-

[Fermer](#)
[Imprimer](#)



API STAPH V4.1



REFERENCE DATE
25/05/15

COMMENTAIRE

BONNE IDENTIFICATION AU GENRE

Galerie API STAPH V4.1
Profil 6 2 1 6 1 5 1
Note(s) POSSIBILITE DE S.intermedius SI VETERINAIRE

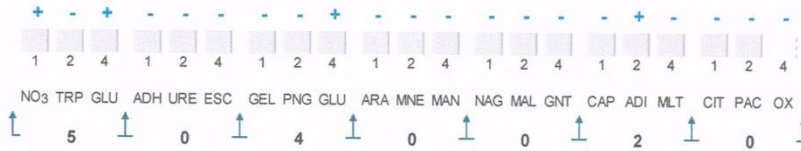
Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
Staphylococcus hominis	57.1	0.79	URE	84%		
Staphylococcus haemolyticus	29.0	0.62	LAC	80%	PAL	3%
Staphylococcus aureus	8.2	0.46	MNE	95%	LAC	88% MAN 80% URE 80%
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
Staphylococcus lugdunensis	2.0	0.37	MNE	88%	PAL	16% ADH 1%
Test(s) complémentaire(s)	COAGULASE	DNase Th	COL.>5mm	TURANOSEac		
Staphylococcus aureus	+	+	+	+(-)		
Staphylococcus haemolyticus	-	-	+	v		
Staphylococcus hominis	-	-	-	+		
Staphylococcus intermedius	+	+	+	-		

⊞ Fermer

⊞ Imprimer



API 20 NE V7.0



REFERENCE DATE
 COMMENTAIRE 27/05/15

IDENTIFICATION ACCEPTABLE

Galerie API 20 NE V7.0
 Profil 5 0 4 0 0 2 0
 Note(s) ID.NON VALIDE AVANT 48H/POSSIBILITE DE Eik.corrodens

Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre							
Pasteurella spp	90.8	0.16	GLU	2%	GLUa	19%	ADla	1%	OX	87%
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre							
Pasteurella pneumotropica	5.2	0.02	URE	85%	PNPG	83%	GLUa	6%	ADla	1%
			OX	84%						

Test(s) complémentaire(s)	MAC CONKEY	SACCHAROSE	OF/O
Pasteurella multocida	v	+	23%
CDC group EF-4 (Pasteurella)	98%	NT	91%
Eikenella corrodens	-	-	NT

[Fermer](#)
[Imprimer](#)



API CANDIDA V2.1



REFERENCE DATE
25/05/15

COMMENTAIRE

BONNE IDENTIFICATION

Galerie API CANDIDA V2.1
Profil 7 7 0 3
Note(s)

Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Trichosporon spp 1	96.9	0.42	TRE 15% αAMY 95%
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Cryptococcus neoformans 1	3.0	0.09	TRE 9% βGUR 99% βNAG 10%

[Fermer](#)

[Imprimer](#)

Glossaire

Conditionnement primaire :

Mise du produit vrac dans un récipient en contact directement avec le produit : (blister ; comprimés, tube ou pot ; pommade, flacon ; sirops).

Conditionnement secondaire :

Mise du récipient primaire dans un autre récipient qui n'est pas en contacte directe avec le produit.

Contamination :

Présence d'une substance étrangère dans un lieu ou dans un produit.

Contrôle qualité :

Échantillonnage, spécifications, contrôle ainsi que procédures d'organisation, de documentation et de libération qui garantissent que les analyses nécessaires et appropriées ont réellement été effectuées et que les matières premières et les articles de conditionnement et les produits ne sont pas libérés pour l'utilisation, la vente ou l'approvisionnement sans que leur qualité n'ait été jugée satisfaisante (BPF).

Échantillon microbiologique :

Petite quantité représentative d'une substance prélevée en asepsie dans un contexte stérile et correctement conservée et manipulée en vue d'examens microbiologiques.

Fabrication :

Ensemble des processus menant de la matière première (poudre/ liquide) au produit vrac (comprimés finis, solution buvable, solution injectable, pommades...).

Filtration sur membrane :

Technique d'élimination ou de concentration des particules des fluides, incluant les micro-organismes (mais non les virus libres), par filtration à travers un filtre de porosité connue (ISO 6107).

Nettoyage

Processus d'élimination et de séparation des souillures visibles d'une surface. L'objectif à atteindre est de l'ordre de la propreté visuelle. Il s'agit en fait de mettre en place des mesures pour éliminer un produit dont la présence à l'état de traces dans un autre produit présente un risque majeur. Nettoyer consiste à éliminer et non à diluer ou à disperser le contaminant. Le nettoyage comprend des actions physiques combinées ou non à une action chimique. Le nettoyage peut être manuel, automatique, réalisé par un équipement de nettoyage en place (NEP).

Pharmacopée Européenne :

La Pharmacopée Européenne est un ouvrage réglementaire, destinée à être utilisée par les professionnels de la santé et constitue un outil unique dans le domaine de la qualité et du contrôle des médicaments en Europe.

La Pharmacopée Européenne définit notamment les critères de pureté des matières premières ou des préparations entrant dans la fabrication des médicaments (à usage humain et vétérinaire), et les méthodes d'analyses à utiliser pour en assurer leur contrôle. L'ensemble des critères permettant d'assurer une qualité optimale est regroupé et publié sous forme de monographies

Prélèvement

Opération qui consiste à prendre une fraction d'une masse ou d'une population selon une procédure définie.

Nom : BOUDANA Prénom : Khedidja	Date de soutenance : 28.06.2015
Thème : Contrôle microbiologique de l'environnement dans l'industrie pharmaceutique NADPHARMADIC Production	
Résumé : Sur la base des résultats obtenus lors du contrôle microbiologique de l'environnement dans l'industrie pharmaceutique NADPHARMADIC Production de Constantine, à partir du laboratoire de contrôle qualité (département de la microbiologie) et de la zone de fabrication (salle de granulation, d'enrobage et de compression), conditionnement (conditionnement primaire et secondaire). L'identification des isolats a été réalisée pour toutes les souches. De ce fait, 01 souche levurienne, 06 souches fongiques, et 09 souches bactériennes ont été isolées. Les résultats montrent que la souche levurienne obtenue appartient au genre <i>Trichosporon</i> , et les souches fongiques appartiennent aux genres <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Microsporium</i> , ainsi que les souches bactériennes appartiennent aux genres <i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Serratia</i> , <i>Pasteurella</i> .	
Mots clés : contrôle microbiologique, biocollecteur, les galeries API, <i>Staphylococcus</i> , <i>Aspergillus sp.</i>	
Laboratoire de la microbiologie : Service Contrôle Qualité, Industrie NADPHARMADIC Production, Constantine.	
Jury d'évaluation : Président de jury : Pr. KACEM CHAOUECHE N. (UFM Constantine) Rapporteur : Dr. KARA ALI M. (UFM Constantine) Tuteur : Mme. ABBAS A. (NADPHARMADIC Production) Examineur : Mme. BENKAHOUL M. (UFM Constantine)	