

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



جامعة الأخوة منتوري قسنطينة  
UNIVERSITÉ DES FRÈRES  
MENTOURI CONSTANTINE



جامعة الأخوة منتوري قسنطينة  
UNIVERSITÉ DES FRÈRES  
MENTOURI CONSTANTINE

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

## *Mémoire*

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

**Par : HAMADOU Naima**  
**MOKHNACHE Asma**

## *Thème*

**Evaluation microbiologique « Bioévaluation » et physicochimique dans  
l'industrie pharmaceutique**

### **Jury d'évaluation:**

**President de jury:** MR. KACEM CHAOUCH Nouredine

**Rapporteur :** M<sup>me</sup> GHERBOUJ Ouissem

**Examineur:** M<sup>me</sup> HALMI Sihem

**Responsable du stage :** M<sup>me</sup> ABADA Meriem

Prof. UFM Constantine 1.

MCB. UFM Constantine1.

MCB. UFM Constantine1.

Doct. en Pharmacie

**ANNEE UNIVERSITAIRE : 2016-2017**

# *Dédicaces*



*Nous dédions ce modeste travail, en premier lieu, aux êtres les plus chers que sont nos parents. Que dieu les bénisse, les protège et leur accorde une longue vie.*

*A nos frères, sœurs, neveux, nièces.....*

*A nos amis.....*

*Aux familles HAMADOU et MOKHNACHE.*



NAIMA & ASMA



# *Remerciements*



*Nous tenons à exprimer notre gratitude, notre reconnaissance, et nos sincères remerciements à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*

*Nos remerciements vont particulièrement à M<sup>me</sup> GHERBOUDJ Ouissem, Maître de conférences, et M<sup>me</sup> ABADA Meriem, Docteur en pharmacie, qui nous ont encadrées et dirigées.*

*Nos remerciements les plus vifs s'adressent au personnel technique de l'UPC qui nous a suivies et dirigées pendant toute la durée du stage, particulièrement M<sup>r</sup> AGGOUNE Mohamed Djallel, M<sup>r</sup> NEKKA A Amine, M<sup>elle</sup> BETCHINE Rayene Kaouther, M<sup>me</sup> MILES Sara, M<sup>elle</sup> AHRIZ Maroua, M<sup>elle</sup> HADEF Amira, M<sup>elle</sup> ATHMANI Kaouther, M<sup>me</sup> HAFIDI Manel, M<sup>me</sup> BOUIMA Imene, et M<sup>me</sup> GHOUBICHE Imene.*

*Nous remercions Le Professeur KACEM CHAOUCH Nouredine de l'Université Constantine 1, nous sommes honorées par sa présence comme président du jury.*

*Nous remercions aussi Mme HALMI Sihem Maître de conférences à l'Université Constantine 1, pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

# TABLE DES MATIERES

Introduction.....	1
-------------------	---

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1.1. L'industrie pharmaceutique .....	3
1.1.1. Généralités sur les médicaments .....	3
1.1.2. Définition d'un médicament .....	3
1.1.3. Mise en forme d'un médicament .....	4
1.1.3.1. Principe actif .....	4
1.1.3.2. Excipient.....	4
1.1.3.3. Récipient.....	4
1.1.4. Evaluation pharmaceutique.....	5
1.1.5. Contrôle pharmaceutique .....	5
1.1.5.1. Qualité d'un médicament dans l'industrie .....	5
1.1.5.2. Définition de la qualité.....	5
1.1.5.3. Contrôle.....	6
1.1.5.4. But du contrôle de la qualité .....	6
1.1.5.5. Contrôle de qualité d'un médicament .....	6
1.2. Contamination microbiologique ou bio-contamination .....	7
1.2.1. Introduction.....	7
1.2.2. Conséquence des bio-contaminations .....	8
1.2.3. Quand suivre la bio-contamination ? .....	8
1.2.3.1. Les matières premières .....	8
1.2.3.2. L'eau.....	9
1.2.3.3. Le produit pendant le processus de fabrication.....	10
1.2.3.4. Le suivi environnemental.....	10
1.2.3.5. Contrôle microbiologique de l'air.....	12
1.2.3.6. Contrôle microbiologique des surfaces.....	14
1.2.3.7. Contrôle du personnel .....	16

## Chapitre 2 : Matériel et méthode

2.1. Présentation de la société (lieu du stage) .....	18
2.2. Equipement du laboratoire .....	19
2.2.1. Matériel.....	19

2.2.2. Appareillage .....	19
2.2.3. Réactifs .....	20
2.3. Echantillonnages .....	20
2.3.1. Eau .....	20
2.3.2. Matière première .....	21
2.3.3. Produit fini .....	22
2.4. Evaluation et Analyse physico-chimique.....	22
2.4.1. Eau.....	22
2.4.1.1. La conductivité.....	22
2.4.1.2. Potentiel d'hydrogène pH .....	22
2.4.1.3. Acidité ou alcalinité .....	23
2.4.1.4. Substance oxydable.....	23
2.4.1.5. Chlorure .....	23
2.4.1.6. Spectrophotomètre UV-Visible .....	23
2.4.2. Matière première .....	24
2.4.2.1. Aspect.....	24
2.4.2.2. Solubilité.....	24
2.4.2.3. Acidité ou alcalinité .....	25
2.4.2.4. Absorbance .....	25
2.5. Evaluation et Analyse microbiologique (Contrôle de la bio-contamination) .....	25
2.5.1. Milieu de culture .....	25
2.5.2. Contrôle de l'aérobiocontamination .....	26
2.5.2.1. Délai d'acheminement et transport .....	26
2.5.2.2. L'incubation.....	27
2.5.2.3. Dénombrement.....	27
2.5.2.4. Choix des points critiques et emplacement des boîtes de pétri dans les plans	27
2.5.3. Contrôle de la matière première et du produit fini.....	31
2.5.3.1. Préparation de l'échantillon .....	31
2.5.3.2. Dénombrement des germes aérobies totaux .....	31
2.5.4. Contrôle de l'eau purifiée .....	32
2.5.4.1. Méthode de Prélèvement d'échantillon .....	32
2.5.4.2. Préparation des témoins .....	32
2.5.4.3. Test d'analyse de l'eau purifiée .....	33

2.5.4.4. Incubation.....	33
2.5.4.5. Dénombrement.....	33

### **Chapitre 3 : résultats et discussions**

3.1. Evaluation physique et chimique .....	34
3.1.1. Contrôle de l'eau de rinçage .....	34
3.1.1.1. Conductivité.....	34
3.1.1.2. Spectre UV-Visible .....	34
3.1.2. Contrôle et validation de la durée de vie de l'eau purifiée .....	36
3.1.2.1. Température ambiante .....	36
3.1.2.2. Température ambiante à l'abri de la lumière .....	38
3.1.2.3. Température réfrigérante .....	40
3.1.3. Contrôle de la matière première.....	42
3.1.3.1. Lactose monohydrate .....	42
3.1.3.2. Stéarate de magnésium .....	45
3.2. Evaluation microbiologique.....	45
3.2.1. Contrôle microbiologique de l'air.....	45
3.2.2. Matière première (Stéarate de magnésium) .....	57
3.2.3. Eau purifiée.....	57
3.2.4. Produit fini (Zetirec) .....	57
Conclusion.....	59

## Liste des tableaux

- Tableau 1: Comparaissant entre les 3 types d'eau.
- Tableau 2 : Nombre maximal de micro-organismes autorisés en ZAC, selon les BPF.
- Tableau 3: Avantages et Inconvénients de la méthode par sédimentation.
- Tableau 4 : Avantages/Inconvénients de la méthode par aspiration
- Tableau 5: Avantages et inconvénients des différentes méthodes de contrôle microbiologique des surfaces.
- Tableau 6: Références des tests 1 et 2.
- Tableau 7: L'échelle exprimant la solubilité d'une substance.
- Tableau 9: Critères d'interprétation des résultats de l'aérobiocontamination.
- Tableau 10: Points critiques de la zone 1.
- Tableau 11: Points critiques de la zone 2.
- Tableau 12: Points critiques de la zone 3.
- Tableau 13: Mesure de la conductivité de l'eau de rinçage.
- Tableau 14: Analyse des différents tests.
- Tableau 15: Suivi de la mesure du pH.
- Tableau 16: Suivi de la conductivité.
- Tableau 17: Différents tests à l'abri de la lumière.
- Tableau 18 : Mesures de ph à température à l'abri de la lumière.
- Tableau 19 : Les mesures de la conductivité de l'eau à l'abri de la lumière.
- Tableau 20 : Différentes analyses à température réfrigérante.
- Tableau 21 : PH de l'eau à la température réfrigérante.
- Tableau 22 : Mesures de la conductivité de l'eau à la température réfrigérante.
- Tableau 23: Aspect, solubilité et acidité du lactose monohydrate.
- Tableau 24: Résultat de l'absorbance solution (a) à la longueur d'onde 400 nm.
- Tableau 25: Absorbance de la solution (b) à la longueur d'onde 210-300 nm.
- Tableau 26: Aspect, solubilité et acidité de stéarate de magnésium.
- Tableau 27 : Résultats de dénombrement de Matière première « stéarate de magnésium ».
- Tableau 28 : Résultats d'analyse microbiologique d'eau purifié.
- Tableau 29 : Résultats d'analyse du produit fini Zetirec.

## Liste des figures

- Figure 1: Mise en forme d'un médicament.
- Figure 2: Méthode par sédimentation pour réaliser un prélèvement d'air passif.
- Figure 3: Méthode par aspiration pour réaliser un prélèvement d'air actif.
- Figure 4: Pétri films.
- Figure 5: Méthode d'étatisation de pétri films.
- Figure 6: Les appareils utilisés pour l'analyse physicochimique.
- Figure 7: Les appareils utilisés pour l'analyse microbiologique.
- Figure 8: Les réactifs utilisés.
- Figure 9: Echantillonnage de l'eau purifiée avant et après rinçage.
- Figure 10: Echantillonnage de l'eau purifiée.
- Figure 11: Produit fini Zetirec.
- Figure 12: Les milieux de culture utilisés.
- Figure 13: Spectre de l'UV de l'eau de rinçage test 1.
- Figure 14: Courbes d'absorbance de l'UV (test2).
- Figure 15: Courbes d'absorbance de l'UV de l'eau à Température ambiante.
- Figure 16: Courbes d'absorbance de l'UV de l'eau à l'abri de la lumière.
- Figure 17: Absorbance de l'UV de l'eau à température réfrigérante.
- Figure 18: Courbe d'absorbance la solution (a).
- Figure 19: Courbe d'absorbance de la solution(b).
- Figure 20 : Histogrammes de la salle de granulation.
- Figure 21 : Histogrammes de la salle de pesée.
- Figure 22 : Histogrammes de la salle de préparation.
- Figure 23 : Histogrammes de la salle de conditionnement primaire.
- Figure 24 : Histogrammes de la salle mélange.
- Figure 25 : Histogrammes de la salle de compression.
- Figure 26 : Histogrammes de la salle de compression.1.
- Figure 27 : Histogrammes de la salle compression.2.
- Figure 28 : Histogrammes de la salle blistéreuse.1.
- Figure 29 : Histogrammes de la salle blistéreuse.2.
- Figure 29 : Histogrammes de la salle géluleuse.

## Glossaire

**AMM** : Autorisation de **M**ise sur le **M**arché.

**ISO** : **O**rganisation **I**nternationale de la **S**anté.

**OMS** : **O**rganisation **M**ondiale de la **S**anté.

**PH** : Potentiel d'hydrogène.

**UFC** : **U**nité **F**ormant **C**olonie.

**PA** : principe actif.

**EP** : Eau purifiée.

**Eau PPI** : Eau pour préparations injectables.

**EHP** : Eau hautement purifiée.

**TSB** : Trypticase soja bouillon.

**TSA** : Trypticase soja agar.

**MGC** : milieu sabouraud-déxtrosé-gélose.

**MGH** : milieu gélosé et liquide de MacConkey.

**BPF** : bonnes pratiques de fabrication.

**ZAC** : zone atmosphère contrôlé.

**MO** : matière organique.

**UPC** : Union Pharmaceutique constantinois.

**UV** : ultra violet.

**Ph. Eur** : Pharmacopée Européenne.

**T** : température.

**C** : conductivité.

**PH** : potentiel hydrogène

**Abs** : absorbance.

**E. coli** : *Escherichia coli*.

**µS** : Microsimece.

**ppm** : partie par million.

**cm** : centimètre.

**ml** : millilitre.

**l** : litre.

**mg** : milligramme.

**m<sup>3</sup>** : mètre cube.

**mm** : millimètre.

**min** : minute

**g** : gramme.

**°C** : degré Celsius.

**nm** : nanomètre.



# Introduction

### *Introduction*

L'industrie pharmaceutique est de nos jours une industrie florissante et importante tant du point de vue de l'innovation que du business. L'enjeu au niveau de la santé publique que représente la production de médicaments nécessite de nombreuses réglementations strictes et contraignantes qui ont pour préoccupations premières d'assurer la qualité, la sûreté, l'efficacité des produits et la satisfaction des clients et des consommateurs. C'est pourquoi les industriels n'ont cessé d'améliorer la qualité de leurs services au fil des temps.

La qualité a pris une importance considérable au cours de l'histoire dans l'industrie, à tel point que des outils spécifiques ont été créés pour permettre son management et son amélioration continue. Les entreprises pharmaceutiques notamment, doivent se conformer à un système d'assurance qualité strict pour être aux normes et répondre aux exigences en matière de qualité, de sécurité et d'efficacité.

La maîtrise de la bio-contamination occupe une place prépondérante dans l'industrie pharmaceutique non seulement pour le médicament, mais également pour son environnement.

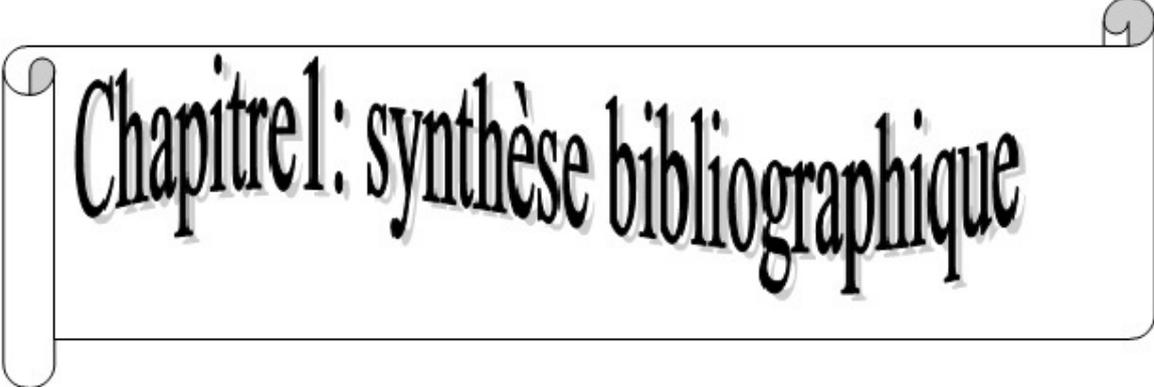
Les microorganismes présents dans un produit peuvent être d'origine virale, bactérienne ou fongique et proviennent principalement de trois sources : l'environnement de fabrication, le personnel et les matières premières y compris l'eau.

Cependant les missions assignées au contrôle microbiologique ont évolué, elles sont présentes tout au long de la chaîne de production (Matières premières, environnements, personnel, matériels, process ...) et au niveau du produit fini pour répondre aux exigences réglementaires.

Ce travail a été réalisé dans le cadre du contrôle de la qualité microbiologique des différentes formes pharmaceutiques des médicaments. Pour mener cette étude le plan de travail suivant a été adopté :

- ✓ Le premier chapitre contient deux parties, la première présente l'industrie pharmaceutique en général. La seconde est consacrée aux contrôles microbiologiques appliqués sur les paramètres précédents (Matières premières, produit fini, eau, environnement et le personnel).
- ✓ Dans le deuxième chapitre, nous présentons la partie pratique : l'aérobiocontamination et le contrôle microbiologique et physico-chimique de l'eau, des matières premières (stéarate de magnésium et lactose monohydrate) et du produit fini.

- ✓ Le troisième chapitre est réservé aux « résultats et discussions » dont les résultats sont représentés graphiquement.
- ✓ Enfin, nous terminons par une conclusion où nous montrons les résultats obtenus ainsi que l'apport de ce modeste.



# Chapitre 1: synthèse bibliographique

## **1.1. L'industrie pharmaceutique**

### **1.1.1. Généralités sur les médicaments**

L'activité de l'industrie pharmaceutique est exercée par les laboratoires pharmaceutiques et les sociétés de biotechnologie et reste un secteur clé et un important moteur de croissance de l'économie mondiale. Cette industrie vacille plus que jamais vers un nouveau modèle économique dans lequel les pays émergents et en voie de développement pourraient bien jouer un rôle majeur (**ministère de l'industrie, 2001**).

Une fois mis au point le médicament, c'est –à- dire retenue la dose efficace, choisie la forme la plus appropriée pour la conservation et la libération du principe actif, l'industrie pharmaceutique est chargée de reproduire le prototype un très grand nombre de fois pour sa distribution nationale et internationale (**R.Denine, 2008**).

L'industrie pharmaceutique Algérienne est confortée à la nécessité de se mettre au diapason de l'évolution des exigences internationales en matière de recherche et de développement de leurs objectifs, la fabrication de médicament de dernière génération capable de prendre en charge les pathologies les plus fréquentes, et ce à moindre cout, tout en respectant les critères d'efficacité et de qualité, de sécurité et de tolérance (**Le Hir, 2001**). L'élaboration d'un médicament est une tâche très prolongée. 10 à 15 ans séparent sa conception de sa commercialisation. On admet que pour 10000 molécules synthétisées et subissant des tests élémentaires in-vitro et in-vivo chez un animal, une vingtaine entreront en préclinique (cinétique et toxicologique), 10 feront l'objet de premiers essais chez l'homme (phase 1), 5 seront testés dans des indications spécifiques (phase 2) (**Marcel et Garnier, 1987**).

### **1.1.2. Définition d'un médicament**

Un médicament est toute substance utilisée pour prévenir, atténuer, ou guérir une maladie ou ses symptômes (**Gaignault, 1982**).

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

### 1.1.3. Mise en forme d'un médicament

Un médicament se compose d'un ou de plusieurs principes actifs et d'excipients. L'ensemble est contenu dans un récipient (Talbert et al, 2001).

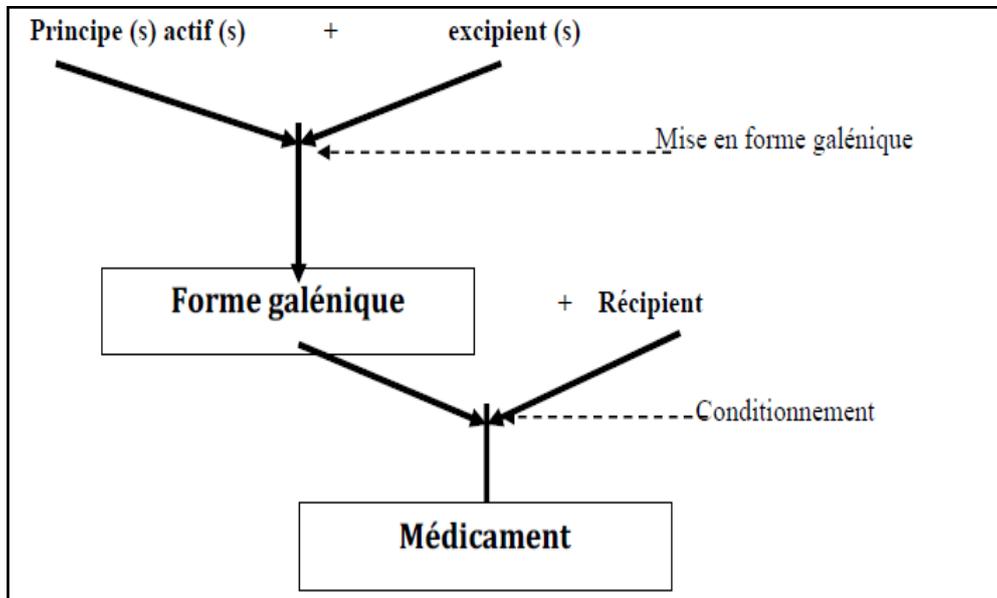


Figure 1: Mise en forme d'un médicament (Talbert et al, 2001).

#### 1.1.3.1. Principe actif

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

#### 1.1.3.2. Excipient

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

#### 1.1.3.3. Récipient

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

#### **1.1.4. Evaluation pharmaceutique**

L'évaluation pharmaceutique a pour objet de s'assurer de la qualité pharmaceutique. Autrement dit, le médicament tel qu'il est remis au malade doit être bien ce qu'il prétend être. C'est le domaine par excellence de la pharmacie et des pharmaciens. On se borne ici à quelques indications succinctes. La qualité pharmaceutique porte sur :

- l'origine des principes actifs et des excipients, les méthodes de synthèse chimique ou les procédés d'extraction et de purification à partir de matériels biologiques.
- les méthodes de fabrication et de mise en forme pharmaceutique.
- les méthodes de contrôle à tous les stades de fabrication, la qualité des ingrédients, la nature et la teneur maximale des impuretés.
- la conservation et la péremption; la stabilité du produit est déterminée par des essais de vieillissement accélérés en conditions extrêmes ou en vraie grandeur.
- la date de péremption figure en clair sur le conditionnement.
- Les conditionnements: ils sont enregistrés et comportent un certain nombre de mentions légales.

#### **1.1.5. Contrôle pharmaceutique**

##### **1.1.5.1. Qualité d'un médicament dans l'industrie**

L'industrie pharmaceutique doit fabriquer et fournir des médicaments adaptés à l'emploi, répondant aux exigences du dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM) et n'exposant les utilisations à aucun risque lié à des carences en matière de sécurité, de qualité, ou d'efficacité. La réalisation de cet objectif de qualité engage la responsabilité de la direction, de l'entreprise et le pharmacien responsable. Elle requiert la participation et l'engagement du personnel dans les différents départements et à tous les niveaux de l'entreprise, des fournisseurs et des distributeurs. Pour atteindre plus sûrement cet objectif, l'entreprise doit posséder un système d'assurance qualité bien conçu, correctement mis en œuvre et effectivement contrôlé, système qui inclut le concept des pratiques de fabrication et ses règles de fonctionnement constitue le moteur de la qualité dans l'industrie pharmaceutique (Anonyme,2001).

##### **1.1.5.2. Définition de la qualité**

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

### 1.1.5.3. Contrôle

Le mot contrôle peut être utilisé dans le sens de vérification ou dans celui de maîtrise. Le contrôle consiste à mesurer une ou plusieurs caractéristiques d'une entité et à comparer les résultats obtenus à des spécifications préétablies (**Le Hir, 2001**). Le contrôle de qualité constitue donc, qui permet de déceler les différents types d'erreurs qui existent lors des déterminations d'analyses quantitatives effectuées dans un laboratoire (**Sussland, 1996**).

- L'erreur peut être grossière lorsqu'elle est due au non respect du protocole expérimental, à une confusion de réactif, de matériel, à une faute de calcul ou de transcription du résultat. C'est le type d'erreur qui peut être évité. Sa fréquence dépend essentiellement du manipulateur (niveau de formation, cadence de travail, etc..).
- l'erreur est aléatoire lorsqu'elle se produit de façon fortuite ou accidentelle. Elle est due à l'impression d'une mesure consécutive à la défaillance momentanée du manipulateur ou d'un appareil.
- l'erreur systématique lorsqu'elle est due à un appareil déréglé un mauvais réactif.

### 1.1.5.4. But du contrôle de la qualité

Le contrôle de qualité consiste à déceler les erreurs dépassant les limites jugées raisonnables de manière à en corriger les causes ou à les prévenir. En général dans tout laboratoire de biologie, le contrôle du fonctionnement des appareils, de la manipulation ainsi que de la précision et l'exactitude d'une technique sont obligatoires (**Vadeville, 1983**).

Le contrôle effectué à des points clés (points critiques) évite d'engager inopportunément des frais coûteux dans la suite des opérations. Le contrôle final détermine la conformité du produit aux objectifs et le contrôle de la conformité ont pour finalité de confirmer que le produit fabriqué localement ou importé répond aux normes homologuées et /ou aux spécifications légales et réglementaires qui le concernent, et en particulier aux prescriptions de l'article 3 de la loi n 89 - 09 de 07 février 1989( analyses de qualité , contrôle de conformité) :Décret exécutif n° 92 - 65 au 12 février 1992 relatif au contrôle de la conformité des produits fabriqués localement ou importés (**Anonyme, 1997**).

### 1.1.5.5. Contrôle de qualité d'un médicament

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

- **Le contrôle physico-chimique**

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

- **Le contrôle microbiologique**

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

- **Le contrôle toxicologique**

Les molécules destinées à la thérapeutique humaine doivent subir avant tout essai clinique des tests de toxicité aiguë et chronique sur les animaux (**Schorderet, 1989**). Ces tests toxicologiques permettent d'éliminer de très nombreuses molécules dont les risques outrepassent les avantages (**Marcel et Garnier, 1987**).

## **1.2. Contamination microbiologique ou bio-contamination**

### **1.2.1. Introduction**

Ce type de contaminants regroupe les micro-organismes (MO) vivants tels que les levures, moisissures, bactéries et virus. Ces organismes ont besoin, pour se développer et se multiplier, de conditions d'humidité et de chaleur. Nous devons donc veiller à maîtriser ces différents paramètres afin de minimiser le risque de développement de MO.

La présence de MO dans les préparations stériles peut engendrer différents problèmes. D'une part si des MO pathogènes ou toxiques sont présents, ils peuvent transmettre leur pouvoir pathogène ou toxique au patient. D'autre part, certains MO peuvent relarguer des endotoxines qui sont responsable de l'effet pyrogène. Ces derniers sont surtout des bactéries à Gram négative, car elles disposent d'une membrane externe riche en lipopolysaccharides. Le lipopolysaccharide contient un liquide appelé lipide A. Lors de la lyse de la bactérie, ce lipide A va se retrouver dans l'environnement et potentiellement peut être transporté jusque le produit à répartir. Le lipide A une fois dans le corps humain va être phagocyté par les macrophages ce qui va induire une réaction immunitaire de type inflammatoire, dont l'effet pyrogène est un des effets (**Ernst T, 1994**).

On entend par bio-contamination « la contamination d'une matière, d'un appareil, d'un individu, d'une surface, d'un liquide, d'un gaz ou de l'air par des particules viables» (**ISO 14698-1 : 2003**).

Les microorganismes peuvent être détectés et quantifiés par des techniques de microbiologie (empreinte sur support gélosé, frottis,...). Ils peuvent avoir deux origines :

- Une origine exogène : les MO proviennent de l'environnement ou d'un contact direct avec l'être humain.
- Une origine endogène : les MO proviennent de ce qui est contaminé.

### **1.2.2. Conséquence des bio-contaminations**

La bio-contamination peut être responsable :

- D'une altération de l'aspect, de l'odeur voir du gout d'un produit. (les MO responsables sont nommés flores d'altération)
- Et/ou d'une pathologie soit en contaminant directement l'homme, soit en contaminant un produit qui devient alors impropre à la consommation et risque d'entraîner des pathologies chez le consommateur (<http://biotech.spip.ac-rouen.fr/>).

### **1.2.3. Quand suivre la bio-contamination ?**

La fabrication de produits pharmaceutiques nécessite des contrôles très sévères pour garantir leur qualité microbienne et leur composition. Ces tests de contrôle microbiologique sont réalisés tout au long de la chaîne de production, de la matière première au produit fini et permettent par exemple de vérifier :

- La stérilité : aucun micro-organisme ne doit être présent.
- L'absence de bactéries pathogènes, comme *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, ou *Salmonella enterica*.
- La non-prolifération d'une bactérie commensale (normalement présente chez l'homme et banale en faible concentration) au-delà d'un certain seuil.

#### **1.2.3.1. Les matières premières**

Celles-ci interviennent dès le début du processus de fabrication, il est donc indispensable que leur qualité microbiologique soit vérifiée. De plus, elles sont souvent coûteuses. L'industriel a donc l'obligation de les contrôler dès réception, et de fournir un certificat d'analyse prouvant la conformité de la charge microbienne (en UFC/g ou UFC/ml). Il doit également les stocker et les utiliser dans un environnement propre.

### 1.2.3.2. L'eau

L'eau purifiée est la plus utilisée dans l'industrie pharmaceutique. Elle est utilisée en tant qu'excipient pour reconstituer un médicament lors des étapes de synthèse du principe actif (PA) ou de la formulation du produit fini ou comme élément principal de nettoyage des cuves, des équipements ou des emballages primaires. Différentes qualités d'eau sont nécessaires selon l'utilisation qui en serait faite. Les différentes qualités d'eau se différencient par leur pureté physico-chimique et microbiologique. Les pharmacopées décrivent ces qualités requises pour chacune des eaux « monographies » et les méthodes d'analyse pour accepter leur conformité et leur mode de génération (EMEA., 2002.).

- **Eau purifiée (EP)**

Eau destinée à la préparation de médicaments autres que ceux qui doivent être stériles et exempts de pyrogènes, sauf exception justifiée et autorisée. On distingue deux types d'eau purifiée:

- ✓ **Eau purifiée en vrac**

L'eau purifiée en vrac est conservée et répartie dans des conditions visant à empêcher la croissance de microorganismes et à éviter toute autre contamination.

- ✓ **Eau purifiée conditionnée en récipients**

L'eau purifiée en vrac répartie en récipients est conservée dans des conditions visant à assurer la qualité microbiologique requise. Elle est exempte de tout additif.

- **Eau hautement purifiée**

Eau destinée à être utilisée dans la préparation de médicaments lorsqu'une eau d'une qualité biologique élevée est nécessaire, sauf dans les cas où l'emploi d'Eau pour préparations injectables est requis.

- **Eau pour préparations injectables (Eau PPI)**

Eau destinée soit à la préparation de médicaments pour administration parentérale à véhicule aqueux (eau pour préparations injectables en vrac), soit à la dissolution ou la dilution de substances ou préparations pour administration parentérale (eau stérilisée pour préparations injectables).

**Tableau 1:** Comparaisant entre les 3 types d'eau

Essai	EP		EHP	EPPI	
	Vrac	Cond. Réc.		Vrac	Stér.PPI
Carbone organique total	< 0.5 mg/l				
Acidité ou alcalinité	Non	Oui	Non	Non	Oui
Conductivité (20°C) µS/cm <	4.3	1.1	1.1	1.1	25 (≤ 10ml) 5 (>10ml)
Substance oxydables	Oui	Oui	Non	Non	Oui
Nitrates : < 0.2 ppm	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Sulfates	Non	Oui	Non	Non	Oui
Aluminium : < 10 ppm	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Ammonium : < 0.2 ppm	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Ca & Mg	Non	Oui	Non	Non	Oui
Métaux lourds : < 0.1 ppm	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Stérilité	Non	Non	Non	Non	Oui
Endotoxines bactériennes	< 0.25UI/ml				
Germes aérobies viables Totaux	100 UFC/ml	10 UFC/ml	10UFC/100ml	10UFC/100ml	Stérile

### 1.2.3.3. Le produit pendant le processus de fabrication

La Pharmacopée fixe des spécifications microbiologiques sur le produit fini selon sa forme pharmaceutique. Les industriels réalisent des tests microbiologiques tout au long de processus de fabrication sur le produit afin de maîtriser au mieux la bio-contamination et d'obtenir un résultat acceptable sur le produit fini. Pour cela, le procédé de fabrication est étudié en détail, les étapes dites « critiques » sont sélectionnés afin de réaliser des analyses microbiologiques sur le produit intermédiaire. Des spécifications en interne sont alors établies: la contamination résiduelle obtenue sur le produit intermédiaire doit être inférieur à la limite préalablement fixée. Cette démarche est particulièrement importante sur les procédés biologiques.

### 1.2.3.4. Le suivi environnemental

La fabrication de médicaments stériles doit obligatoirement se faire dans des Zones Atmosphère Contrôlées (ZAC). On entend par ZAC une pièce dont « le contrôle de la contamination particulaire et microbienne dans l'environnement est défini, construit et utilisé

de façon à réduire l'introduction, la multiplication ou la persistance de contaminants » (**BPF, 2011**). On distingue quatre classes de ZAC (**BPF, 2015**)

- **Classe A**

C'est la classe la plus contraignante, où l'environnement de production doit être le plus stérile possible. Les postes de travail sous flux d'air laminaire satisfont normalement aux conditions requises pour ce type d'opérations. Afin de garantir le maintien de cette classe, des points de prélèvements sont réalisés afin de suivre la conformité réglementaire. Sont identifiés les points où sont réalisées les opérations à haut risque, tels que le point de remplissage, les emplacements des bols vibrants de bouchons, les ampoules et les flacons ouverts ou les points de raccordements aseptiques.

- **Classe B**

Elle est utilisée dans le cas d'opérations aseptiques de préparation et de remplissage. La classe B est l'environnement immédiat d'une zone de travail de classe A.

- **Classes C et D**

Ce sont des zones à atmosphère contrôlée destinées aux étapes moins critiques de la fabrication des médicaments stériles.

Un programme de suivi environnemental couvrant tous les postes de production incluant l'air, les sols, les murs, et les surfaces des équipements doit être mis en place. Ce suivi doit obligatoirement inclure les points critiques qui entrent en contact direct avec les produits, le contenant ou le système de fermeture de ce contenant (**Bonnes pratique de fabrication., 2011.**).

Le suivi environnemental doit être « procédure », c'est-à-dire que des procédures doivent être rédigées et respectées. Ce suivi est ainsi défini en termes de durée, fréquence et localisation (points de prélèvement). Il concerne les particules et les MO potentiellement présents dans les ZAC (**FDA., 2004.**).

Dans les BPF, des limites de contamination des surfaces en cours d'activité sont données en fonction de la classe d'air dans laquelle se trouve cette surface (**Tableau 2**).

**Tableau 2 :** Nombre maximal de micro-organismes autorisés en ZAC, selon les BPF (BPF, 2014).

Limite recommandées de contamination microbiologique (a)				
Classe	Echantillon d'air UFC/m <sup>3</sup>	Boîtes de Pétri (diamètre 90 mm), UFC/4 heures (b)	Géloses de contact (diamètre 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	-

**Note :** (a) Il s'agit de valeurs moyennes.

(b) Certaines boîtes de Pétri peuvent être exposées pendant moins de quatre heures.

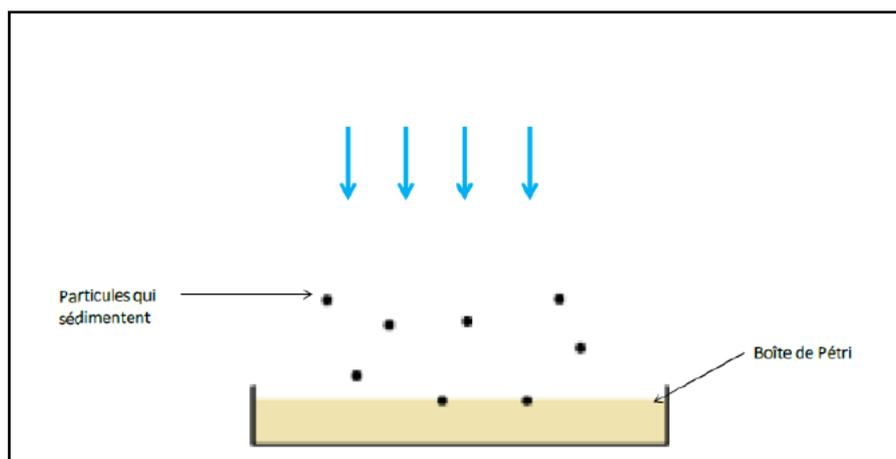
### 1.2.3.5. Contrôle microbiologique de l'air

L'air est un important vecteur de contamination. On y trouve surtout des bactéries à Gram + (*Micrococcus*, *Bacillus*), et des spores de champignons. Les micro-organismes de l'air sont présents sur des particules de plus grande taille (squames, microgouttelettes de salive, poussières).

- **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 (**Figure 2**).

Cette méthode simple à mettre en œuvre présente l'inconvénient majeur de la durée de prélèvement (**Tableau 3**).



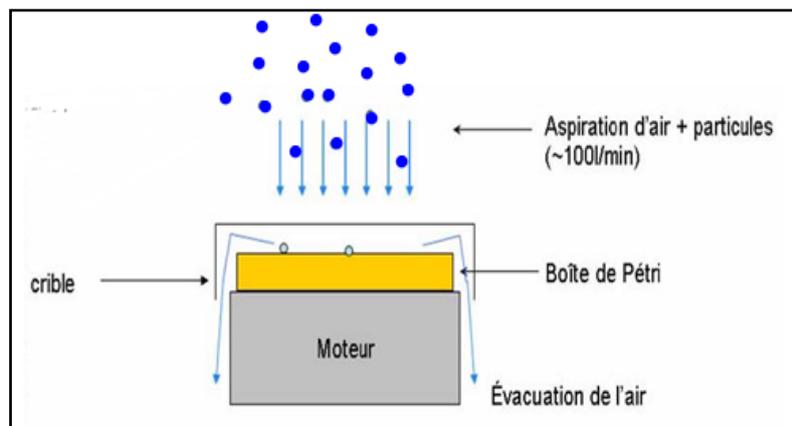
**Figure 2:** Méthode par sédimentation pour réaliser un prélèvement d'air passif

**Tableau 3:** Avantages et Inconvénients de la méthode par sédimentation

Avantages	Inconvénients
Pas besoin de matériel spécifique	Temps de prélèvements long (jusqu'à 4 heures par boîte)
Méthode peu couteuse en matériel	Seuls les MO qui tombent sur la gélose seront détectés. Ce n'est pas une méthode quantitative.

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

Des biocollecteurs d'air microbien sont utilisés afin de réaliser le prélèvement. Un certain volume d'air est aspiré au travers d'un crible qui permet de faire s'impacter les MO et particules sur une boîte de Pétri contenant un milieu gélosé (**Figure 3**). Le volume aspiré doit être représentatif de la zone considérée. Le débit de l'air doit être suffisant pour pouvoir prélever 1 m<sup>3</sup> d'air dans un temps raisonnable et afin d'obtenir une vitesse d'impaction appropriée, et d'assurer l'impaction des particules tout en assurant la conservation de la viabilité des particules. Cette méthode nécessitant l'usage d'un équipement présente également l'inconvénient majeur de la durée de prélèvement (**Tableau 4**).

**Figure 3:** Méthode par aspiration pour réaliser un prélèvement d'air actif**Tableau 4 :** Avantages/Inconvénients de la méthode par aspiration

Avantages	Inconvénients
Facile d'utilisation	Altération de la viabilité des MO si temps de prélèvements trop long.
Maniable	Dessèchement de la gélose si temps de prélèvement trop long
Rapidité de prélèvement (environ 10 minutes pour 1m <sup>3</sup> d'air prélevé)	Cout du matériel

### 1.2.3.6. Contrôle microbiologique des surfaces

Toutes les surfaces doivent faire l'objet d'un suivi, que ce soient les sols, les murs ou les surfaces des équipements. Différentes méthodes existent. Celles-ci sont propres à chaque entreprise et doivent avoir été validées par des tests appropriés.

- **Méthodes par empreinte**

- ✓ **Boîte contact**

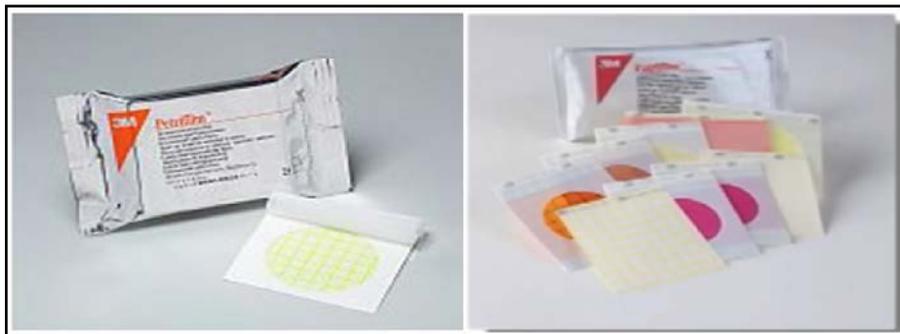
Il s'agit d'une boîte de Pétri possédant un ménisque de milieu de culture convexe. La boîte est fixée à un appareil permettant une application facilitée sur la surface à contrôler : l'applicateur de boîte contact. Il permet d'appliquer une pression définie et un temps de contact défini. Cet appareil 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 gélosée**

Elle est recouverte de chaque côté par un milieu de culture. On applique directement le milieu de culture sur la surface à contrôler.

- ✓ **Pétri film**

Il s'agit d'un milieu gélosé déshydraté placé entre deux films. On l'applique directement sur la surface à contrôler après réhydratation (**Figure 4**).

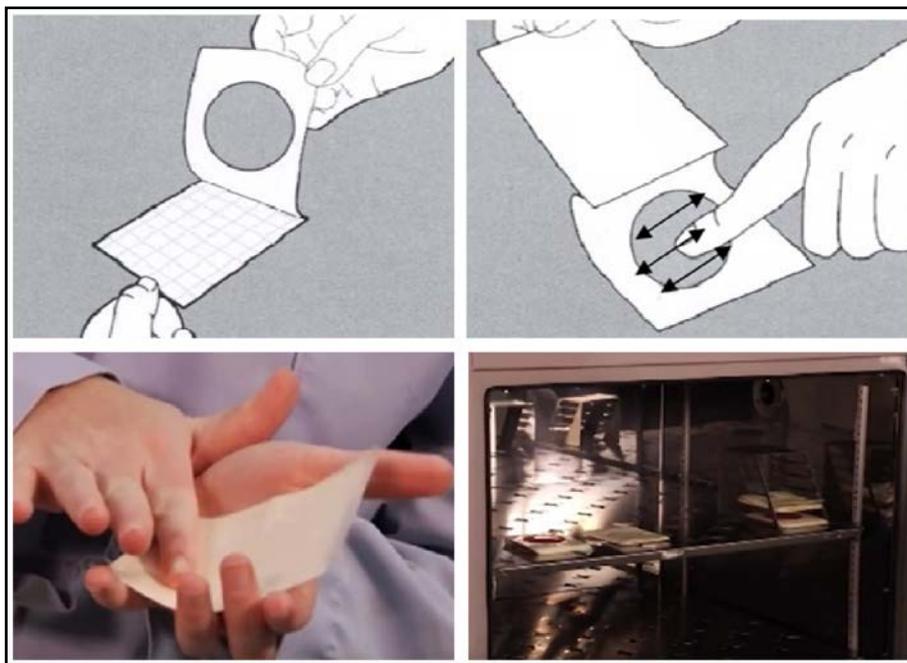


**Figure 4:** Pétri films

La figure 5 montre la méthode d'utilisation des pétri films

1. Sortir les PETRIFILMS de leur emballage.
2. Soulever doucement le film supérieur avec lequel la gélose se décolle, en évitant de toucher cette gélose (représentée par le rond sur le schéma).

3. Appliquer le cercle de gélose du film supérieur sur la surface à contrôler. A l'aide d'un doigt, assurer le contact entre la gélose et la surface en appuyant doucement sur la face externe du film supérieur sans l'écraser.
4. Laisser en contact environ 10 secondes.
5. Retirer doucement le PETRIFILM de la surface, refermer le PETRIFILM sans toucher ni endommager la gélose. Bien noter sur le bord du PETRIFILM, l'établissement prélevé ou le numéro de dossier, le type de surface contrôlée avec la date du jour.
6. Désinfecter à l'aide d'une lingette la surface prélevée afin d'éliminer les traces de gélose ou remettre à laver.



**Figure 5:** Méthode d'étatisation de pétri films

- **Méthode par écouvillonnage**

Un écouvillon sec ou humidifié est frotté contre la surface à contrôler. Cet écouvillon sert ensuite à ensemer des milieux de culture.

- **Méthode par chiffonnettes ou épongettes**

La méthodologie est identique à l'écouvillonnage. Après prélèvement, les milieux de culture sont mis à incuber à température adéquate. Plusieurs approches sont donc mises en œuvre pour réaliser le contrôle des surfaces, caractérisées par certaines limites. Elles sont complémentaires ou spécifiques et donc adaptées selon le besoin (**Tableau 5**).

**Tableau 5:** Avantages et inconvénients des différentes méthodes de contrôle microbiologique des surfaces.

	<b>Boîte contact</b>	<b>Lame gélosée</b>	<b>Ecouvillonnage</b>
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

### 1.2.3.7. Contrôle du personnel

Le personnel est un vecteur potentiel important de contamination croisée. Tous les membres du personnel doivent être conscients des principes des bonnes pratiques de fabrication qui les concernent. Les BPF leur consacrent même un chapitre entier : le chapitre 2, (*Bonnes pratique de fabrication., 2011.*).

L'hygiène du personnel est primordiale pour réduire le risque de contamination des produits fabriqués. Le respect de ces règles d'hygiène doit être observé par tout individu pénétrant dans les zones de fabrication et de contrôle. Ainsi, dans chaque zone d'activité, le personnel porte une tenue adaptée aux classes de risque des produits manipulés. Le passage d'une zone classée à une autre s'effectue par l'intermédiaire d'un sas personnel faisant office de vestiaire. Les techniques d'habillement, de lavage et de désinfection des mains et l'utilisation des sas sont acquises par le personnel et elles sont consignées dans les procédures. Cheveux et barbes doivent être couverts.

Pour éviter tout contact direct entre main et produit, des gants sont portés et changés régulièrement pour éviter la contamination croisée.

Dans les zones les plus sensibles, un vêtement en fil continu est recommandé afin de :

- ☞ éviter le transfert de contaminant par les fibres,
- ☞ faciliter l'élimination des contaminants non solubles lors du lavage,
- ☞ permettre le contrôle particulière.

Les tenues de travail ne doivent pas comporter des aspérités susceptibles de retenir les contaminants. Il faut proscrire en particulier : poches, ceintures, cols abattus, porte badges, manchettes, etc.

Des échantillons microbiologiques des surfaces des gants de chaque opérateur doivent être prélevés. Des prélèvements supplémentaires peuvent être réalisés pour le personnel travaillant en zones de classe A/B, par exemple un contact de la cagoule, des avant-bras et du torse.

De plus, chaque personne travaillant dans les locaux de production suit au préalable des formations qui la certifient à exercer les tâches qui lui sont confiées. Le personnel doit être correctement formé et qualifié pour réaliser toute opération qui est spécifique à son poste de travail. L'entreprise est particulièrement vigilante pour les opérations manuelles telles que le conditionnement de produits semi-finis. Cette formation et cette qualification initiale sont ensuite relayées par une formation continue et une revalidation périodique qui assure le respect des bonnes pratiques de production.



## Chapitre 2: Matériel et méthode

## 2.1. Présentation de la société (lieu du stage)

L'étude a été réalisée à l'unité UPC (**Union Pharmaceutique constantinoise**), entre le mois de mai et août 2017 (4 mois).

L'UPC est un laboratoire pharmaceutique constantinois, indépendant, fondé en 1997 par Mr. Salah ARABET. Il s'est développé très rapidement sur un marché en pleine croissance. Dans le domaine de l'importation depuis 1998, sa politique a été orientée vers le conditionnement et très rapidement vers la production de molécules de qualité dans des domaines thérapeutiques essentiels comme la cardiologie, la gastro-entérologie, la diabétologie, la pédiatrie, l'ORL, la psychiatrie, la neurologie, la stomatologie, pour la santé des algériens et pour un coût accessible à tous.

Cette unité fabrique et/ou conditionne et contrôle environ 30 produits pharmaceutiques sous différentes formes, telles que : comprimés, comprimés pelliculés, poudre à usage cutané, gélules, capsules molles, sirops, suspensions buvables etc...

L'UPC est composé de 03 sites :

- **Palma** : site de production et de contrôle est le premier site de production des hormones en Algérie
- **Rhumel** : site d'importation et de distribution (région de l'est Algérien) des produits pharmaceutiques
- **Rouiba** (Alger) : une succursale de distribution pour le centre et l'ouest de l'Algérie.

## 2.2. Equipement du laboratoire

### 2.2.1. Matériel

Le matériel utilisé pour l'analyse physicochimique est constitué de: pipettes (1 ml, 10 ml, 5 ml), béchers (100ml), poires, flacons, papier absorbant, papier aluminium, seringues, fioles jaugées (10ml), entonnoirs, burettes, spatules, gants, eau purifiée, verre de montre et Baran.

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

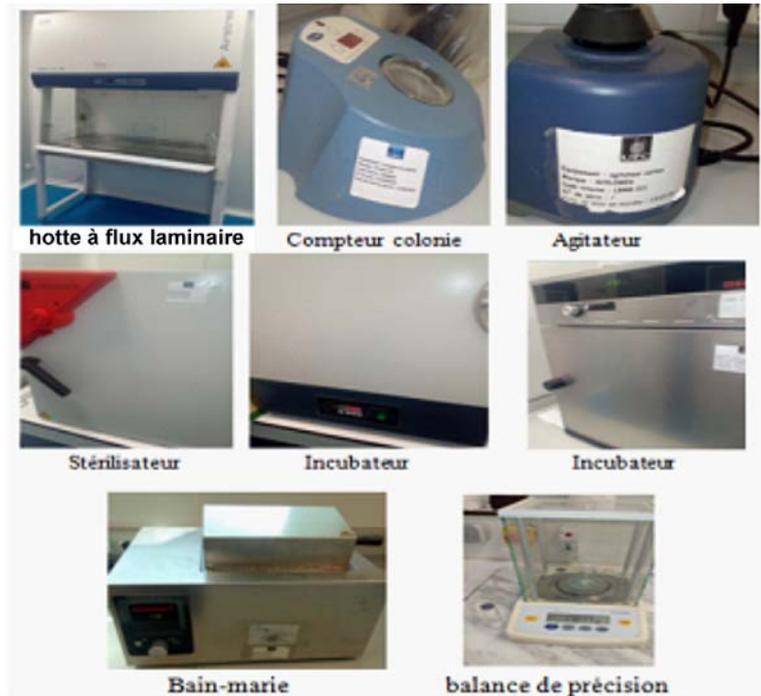
### 2.2.2. Appareillage

Les appareils utilisés pour l'analyse physicochimiques sont illustrés par les images ci-dessous.



**Figure 6:** Les appareils utilisés pour l'analyse physicochimique

Les appareils utilisés dans l'analyse microbiologique sont représentés par les images suivantes :



**Figure 7:** Les appareils utilisés pour l'analyse microbiologique

### 2.2.3. Réactifs

Les réactifs utilisés dans l'analyse physicochimique sont le rouge de méthyle, le bleu de Bromothymol, l'acide sulfurique dilué R, le permanganate de potassium 0.02M, l'acide nitrique dilué R, le nitrate d'argent R2, la phénolphtaléine R, eau R, NaCl et K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (**Figure 8**).



**Figure 8:** Les réactifs utilisés

## 2.3. Echantillonnages

### 2.3.1. Eau

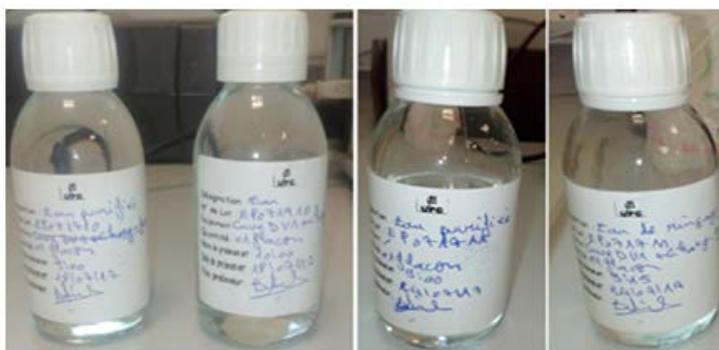
Des échantillons d'eau ont été prélevés dans des conditions différentes :

- ✓ Echantillons d'eau purifiée avant et après rinçage (**Tableau 6, Figure 9**),

- ✓ Echantillon d'eau placé dans un environnement à température ambiante (Figure 10a),
- ✓ Echantillon d'eau placé dans un environnement à température réfrigérante de 2°C à 8°C (Figure 10b),
- ✓ Echantillon d'eau placé dans un environnement à température ambiante à l'abri de la lumière (Figure 10c).

**Tableau 6:** Références des tests 1 et 2

		Numéro du lot	Date de prélèvement	Heure de prélèvement
Test 1	Eau purifiée	EP071710	18/07/2017	9h00
	Eau de rinçage	EP071710	18/07/201	10h00
Test 1	Eau purifiée	EP071711	24/07/2017	9 h00mn
	Eau de rinçage	EP071711	24/07/2017	9h15mn

**Figure 9:** Echantillonnage de l'eau purifiée avant et après rinçage.**Figure 10:** Echantillonnage de l'eau purifiée

### 2.3.2. Matière première

Un seul lot constitué de lactose monohydrate et de stéarate de magnésium a été analysé. Les prélèvements ont été faits par les techniciens de l'entreprise.

### 2.3.3. Produit fini

Les prélèvements ont été réalisés par les techniciens de l'entreprise. Il s'agit du lot 02614 (Fab : 07/2017, Exp : 07/2019) contenant 10 bouteilles de 15 ml de Zetirec, médicament conçu pour le traitement des symptômes de l'urticaire chronique idiopathique.



Figure 11: Produit fini Zetirec

## 2.4. Evaluation et Analyse physico-chimique

### 2.4.1. Eau

#### 2.4.1.1. La conductivité

C'est la mesure directe du courant passant entre deux électrodes immergées dans l'échantillon. Le courant injecté est un courant alternatif de très basse fréquence afin d'éviter la polarisation des électrodes.

La mesure de la conductivité de l'eau s'effectue en immergeant dans la solution une cellule de mesure comportant deux électrodes de platine. Le conductimètre affiche directement une conductivité.

#### 2.4.1.2. Potentiel d'hydrogène pH

C'est une valeur qui représente conventionnellement la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse. En d'autres termes c'est le décimal négatif de l'activité des ions hydrogène en solution. Sa détermination est faite à l'aide d'un PH-mètre (**madingar, 2008**).

La valeur du pH est souvent importante pour la conservation et pour les incompatibilités. Cette détermination se fait avec des réactifs colorés ou des pH-mètres soit directement sur les suspensions, soit après agitation avec de l'eau distillée (**Hir, 1997**).

- ✓ L'appareil a été étalonné avant la mesure avec des solutions tampons à pH=7, pH=4 et pH=9.
- ✓ Après rinçage de l'électrode en verre avec de l'eau purifiée, environ 100 ml d'eau à analyser ont été versés dans un bécher dans lequel est trempée l'électrode. On laisse stabiliser un moment et on note le pH.

#### 2.4.1.3. Acidité ou alcalinité

- **Acidité**

A 10 ml d'eau purifiée conditionnée en récipients, récemment bouillie puis refroidie dans un flacon de verre borosilicaté, 0,05 ml (une goutte) de solution de rouge de méthyle ont été ajoutés. La solution ne se colore pas en rouge (**Ph.Eur, 2008**).

- **Alcalinité**

A 10 ml d'eau purifiée conditionnée en récipients, 0,1 ml (2 gouttes) de solution de bleu de Bromothymol ont été ajoutés. La solution ne se colore pas en bleu (**Ph.Eur, 2008**).

#### 2.4.1.4. Substance oxydable

Ce test, pendant longtemps, était le seul essai qui pouvait tenter de prouver l'absence ou la présence très limitée de résidus organiques dans l'eau pour l'usage pharmaceutique.

Un mélange de 10 ml d'eau purifiée conditionnée en récipient, de 1 ml d'acide sulfurique dilué R et de 0,05 ml de permanganate de potassium 0,02M, a été chauffé à ébullition pendant 5min. La solution reste légèrement rose (**Ph.Eur, 2008**).

#### 2.4.1.5. Chlorure

Les chlorures sont présents dans eaux à l'état brut et transformés à des concentrations allant de petites traces jusqu'à plusieurs centaines de mg/l. Ils sont présents sous la forme de chlorures de sodium, de calcium et de magnésium.

A 10 ml d'eau purifiée conditionnée en récipients, on a ajouté 1 ml d'acide nitrique dilué R et 0,2 ml de solution de nitrate d'argent R2. L'aspect de la solution ne présente aucun changement pendant au moins 15 min (**Ph.Eur, 2008**).

#### 2.4.1.6. Spectrophotomètre UV-Visible

Spectroscopie Etude des interactions entre la matière et un rayonnement électromagnétique.

- ✓ Tout d'abord on allume l'appareil du spectre UV, on attend jusqu'à ce que l'appareil termine l'étalonnage, puis on introduit le code : CE puis on appuie sur le bouton F4.
- ✓ On ouvre le programme UV Probe pour mesurer l'absorbance de l'eau, ensuite on vérifie qu'il n'y a pas les cuves dans le spectre, et on clique sur connected.
- ✓ On choisit la longueur d'onde (généralement entre 200 et 400) et on commence l'analyse.
- ✓ On assure que les cuves sont bien nettoyées, puis on fait le blanc avec l'eau purifiée de station, et on clique sur Baseline.
- ✓ Puis, on mesure l'absorbance de l'échantillon en cliquant sur Start.

## 2.4.2. Matière première

### 2.4.2.1. Aspect

L'aspect de la poudre de lactose monohydrate et stéarate de magnésium est estimé visuellement.

### 2.4.2.2. Solubilité

La solubilité est la capacité d'une substance à être en solution et être dissoute pour obtenir un liquide homogène (**Anonyme ,2005**).

Les indications de solubilité figurant sous la rubrique Caractères sont exprimées en termes ayant la signification suivante pour une température de 15°C à 25 °C (**Tableau 7**) (**Ph.Eur, 2008**).

**Tableau 7:** L'échelle exprimant la solubilité d'une substance

Termes descriptifs	Volumes approximatifs de solvants en millilitres par gramme de substance
Très soluble	inférieur à 1
Facilement soluble	de 1 à 10
Soluble	de 10 à 30
Assez soluble	de 30 à 100
Peu soluble	de 100 à 1000
Très peu soluble	de 1000 à 10 000
Pratiquement insoluble	Plus 10000

- **Lactose monohydrate**

A l'aide d'une balance de précision, on pèse des quantités différentes de lactose monohydrate et on met dans :

- Le tube 1 :1g de lactose monohydrate dans 10ml d'eau purifié.
- Le tube 2 :1g de lactose monohydrate dans 10000 ml d'éthanol 96%.

On agite les 2 tubes pendant 2 à 3 minutes.

- **Stéarate de magnésium**

A l'aide d'une balance de précision, on pèse des quantités différentes de lactose monohydrate et on met dans :

- Le tube 1 :1g de Stéarate de magnésium dans 10000ml d'eau purifié.
- Le tube 2 :1g de Stéarate de magnésium dans 10000 ml d'éthanol 96%.

On agite les 2 tubes pendant 2 à 3 minutes.

### 2.4.2.3. Acidité ou alcalinité

Dissolvez en chauffant 6,0 g de lactose monohydrate dans 25 ml d'eau exempte de dioxyde de carbone R. Refroidissez et ajoutez 0,3 ml de solution de phénolphtaléine R. La solution est incolore. Le virage de l'indicateur au rose ne nécessite pas plus de 0,4 ml d'hydroxyde de sodium 0,1 M. **(Ph.Eur, 2008)**.

### 2.4.2.4. Absorbance

Le dosage du principe actif dans le mélange est comparé avec les normes en vigueur **(Anonyme, 1985)**. Deux solutions à examiner ont été préparées :

- **La solution (a)**: 1,0 g de lactose monohydrate a été dilué dans de l'eau R en complétant à 10,0 ml avec le même solvant. Sa région spectrale est de 400 nm.

- **La solution (b)**: 1,0 ml de solution à examiner (a) a été prélevé en complétant à 10,0 ml avec de l'eau R. Sa région spectrale est entre 210 à 300 nm.

## 2.5. Evaluation et Analyse microbiologique (Contrôle de la bio-contamination)

### 2.5.1. Milieu de culture

Suivant les besoins expérimentaux, divers types de milieux de culture ont été utilisés :

- ✓ Pour l'enrichissement des bactéries, levures et moisissures le milieu Trypticase soja bouillon (TSB) a été employé.
- ✓ Pour le dénombrement des bactéries. le milieu Trypticase soja agar (TSA) a été utilisé car il est jugé comme milieu standard pour le développement des germes aérobies totaux.

- ✓ Pour tester la présence des levures et moisissures, le milieu MGC (milieu sabouraud-déxtrosé-gélose) a été employé.
- ✓ Pour la recherche d'*Escherichia coli* le milieu gélosé et liquide de MacConkey (MGH) a été utilisé.

Tous ces milieux de cultures ont été tous autoclavés pendant 15 minutes à 121°C avant leurs utilisations.



**Figure 12:** Les milieux de culture utilisés

### 2.5.2. Contrôle de l'aérobiocontamination

Avant toutes opérations, il est indispensable de porter une blouse jetable, une charlotte et des sur-chaussures. Ensuite il faut se laver les mains avec du savon liquide et les désinfecter avec de l'alcool à 70%, mettre des gants et définir les points critiques des salles.

On Liquéfie au bain marie à 100°C le milieu gélose TSA et on laisse refroidir à une température ne dépassant pas 45°C. Ensuite, devant le PSM, on coule environ 15-20ml du milieu TSA dans des boîtes de pétri de 90mm qu'on laisse se solidifier à une température ambiante. L'identification de chaque boîte est faite clairement en écrivant en petites lettres, au marqueur permanent sur la bordure de la boîte, jamais sur le couvercle pour faciliter la lecture.

On retire les couvercles des boîtes en les retournant des bouts des doigts. On les laisse à l'endroit à contrôler dans la zone de fabrication pendant 4 heures à l'air libre. On referme les boîtes et on les retourne sur leurs couvercles (couvercles en bas).

#### 2.5.2.1. Délai d'acheminement et transport

On place les boîtes retournées sur leurs couvercles dans une glacière avec des blocs réfrigérants. On les expédie au laboratoire le plus rapidement possible, avant 4 heures de temps.

### 2.5.2.2. L'incubation

Les boîtes gélosées, arrivées à destination, sont placées en position inversée dans l'étuve à  $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$  pendant 05 jours tout en faisant une lecture à 48 heures.

### 2.5.2.3. Dénombrement

On dénombre les germes contenus dans les boîtes à l'aide d'un appareil (compteur colonies). Lorsque plusieurs points critiques existent dans une salle, on fait la moyenne des boîtes pour calculer le nombre de germes aérobies viables totaux. Les critères d'interprétation des résultats sont définis par trois niveaux (**Tableau 9**)

**Tableau 9:** Critères d'interprétation des résultats de l'aérobiocontamination

Les classes	Recherche	Norme		
		Cible	Alerte	Action
Classe A	Germe aérobies viable totaux	<1	1	> 1
Classe B		<5	5	>5
Classe C		<50	50	>50
Classe D		<100	100	>100

### 2.5.2.4. Choix des points critiques et emplacement des boîtes de pétri dans les plans

Les points de prélèvement doivent être représentatifs de la qualité de l'air ou la qualité des surfaces en contact du produit ; ils doivent aussi être accessibles et présentant le plus grand risque de contamination.

Ces points de prélèvement doivent être choisis aux endroits les plus exposés ; surtout à l'entrée de la salle, au niveau des ouvertures, devant la grille de reprise, des équipements auxquels le produit est exposé directement à l'air, sur les paillasses, dans tous endroits où le personnel est présent de manière permanente, sous la hotte et les coins.

Les points critiques choisis sont représentés dans les tableaux 10,11, 12 ci-dessous :

**Tableau10:** Points critiques de la zone 1

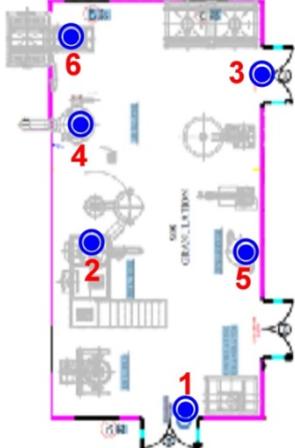
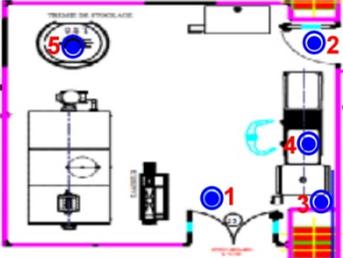
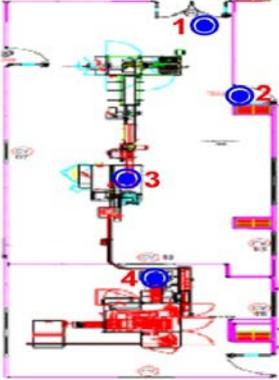
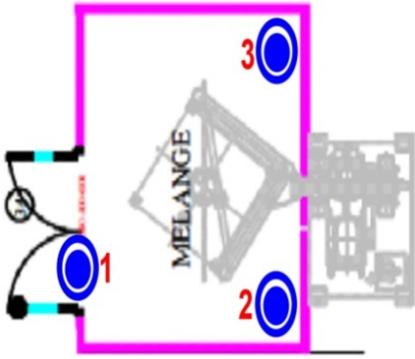
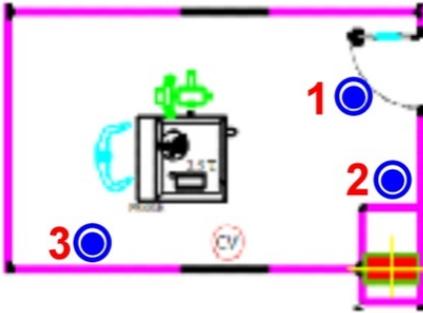
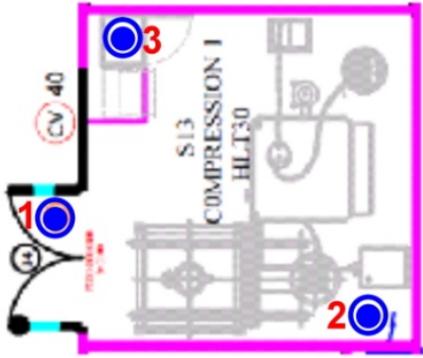
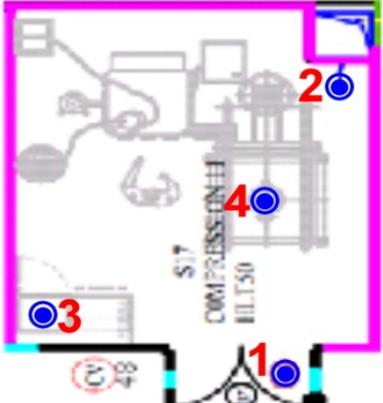
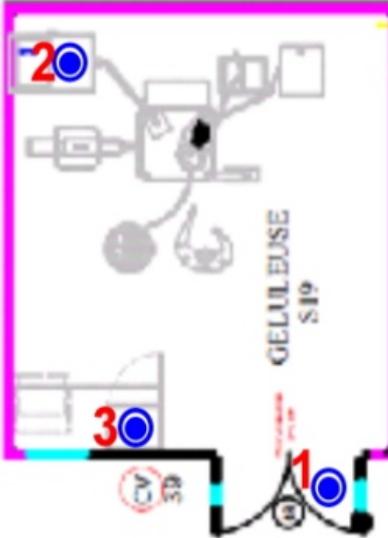
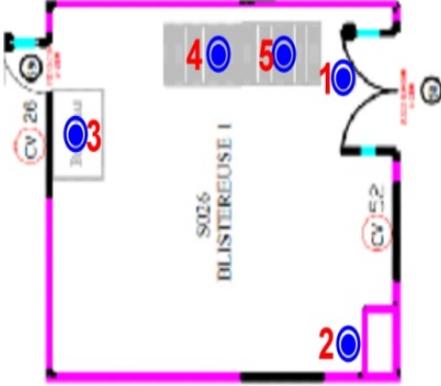
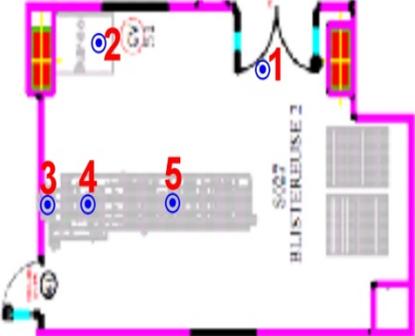
Zone	Salle	Plan de la salle	Emplacement des boîtes de pétri dans la salle
<b>ZONE 1</b>	<b>Salle de granulation</b>		<p>1 : l'entrée de la salle                  2 : granulateur                  3 : l'entrée matériel propre                  4 : LAF                  5 : tamiseur vibreur                  6 : étuve de séchage</p>
	<b>Salle de pesée</b>		<p>1 : entrée de SAS                  2 : grille de reprise                  3 : entrée de la salle réconciliation                  4 : porte de laverie cotée cabine</p>
	<b>Salle de préparation</b>		<p>1 : entrée de la salle                  2 : entrée de la SAS                  3 : grille de reprise                  4 : station de pesée                  5 : tamiseur rotative</p>
	<b>Conditionnement primaire</b>		<p>1 : entrée de la salle                  2 : grille de reprise                  3 : trimé de compression                  4 : remplissage tube</p>

Tableau 11: Points critiques de la zone 2

Zone	salle	Plan de la salle	Emplacement des boîtes de pétri dans la salle
<b>ZONE 2</b>	Salle de mélange	 <p>Le plan de la salle de mélange est un rectangle avec une porte à gauche. Trois boîtes de pétri sont indiquées par des cercles bleus numérotés : 1 est à l'entrée, 2 est dans le coin inférieur droit, et 3 est dans le coin supérieur droit. Le mot 'MELANGE' est écrit au centre.</p>	<p>1 : l'entrée de la salle                  2 : coin droit                  3 : coin gauche</p>
	Salle de compression	 <p>Le plan de la salle de compression est un rectangle avec une porte à droite. Trois boîtes de pétri sont indiquées par des cercles bleus numérotés : 1 est à l'entrée, 2 est dans le coin inférieur droit, et 3 est dans le coin inférieur gauche. Une machine à compression est visible au centre.</p>	<p>1 : entrée de la salle                  2 : grille de reprise                  3 : table de travail</p>
	Salle de compression 1	 <p>Le plan de la salle de compression 1 est un rectangle avec une porte à gauche. Trois boîtes de pétri sont indiquées par des cercles bleus numérotés : 1 est à l'entrée, 2 est dans le coin inférieur droit, et 3 est dans le coin supérieur gauche. Le mot 'COMPRESSION I' est écrit au centre.</p>	<p>1 : entrée de la salle                  2 : grille de reprise                  3 : table de travail</p>
	Salle de compression 2	 <p>Le plan de la salle de compression 2 est un rectangle avec une porte à gauche. Quatre boîtes de pétri sont indiquées par des cercles bleus numérotés : 1 est à l'entrée, 2 est dans le coin supérieur droit, 3 est dans le coin inférieur gauche, et 4 est au centre. Le mot 'COMPRESSION II' est écrit au centre.</p>	<p>1 : entrée de la salle                  2 : grille de reprise                  3 : table de travail                  4 : trimé poudre</p>

**Tableau 12:** Points critiques de la zone 3

Zone	Salle	Plan de la salle	Emplacement des boîtes de pétri dans la salle
<b>ZONE 3</b>	<b>Salle de géruleuse</b>		<p>1 : l'entrée de la salle                  2 : grille de reprise                  3 : table de travail</p>
	<b>Salle de blistereuse 1</b>		<p>1 : entrée de la salle                  2 : grille de reprise                  3 : table de travail                  4 : connexion en cartonneuse                  5 : trimé blister</p>
	<b>Salle de blistereuse 2</b>		<p>1 : entrée de la salle                  2 : table de travail                  3 : connexion en cartonneuse                  4 : trimé blister                  5 : tapis blister</p>

### 2.5.3. Contrôle de la matière première et du produit fini

#### 2.5.3.1. Préparation de l'échantillon

- **Matière première : Stéarate de magnésium**

En première étape, un flacon de 90 ml d'eau peptone duquel ont été ôtés 5 ml remplacés par 5ml de Tween 80 a été pris. Le tout a été agité pour bien homogénéiser la préparation.

En deuxième étape, 10 g de stéarate de magnésium à analyser ont été ajoutés à cette préparation. Le tout est encore une autre fois bien agité pour assurer une homogénéité (dilution  $10^{-1}$ ). (Ph.Eur, 2008).

- **Produit fini : Zetirec**

La première étape est la même que la précédente.

En deuxième étape, 20 gouttes de chaque flacon de Zetirec, il y en a 10, sont ajoutés à la préparation précédente et l'ensemble est bien agité pour obtenir une homogénéité (dilution  $10^{-1}$ ). (Ph.Eur, 2008).

#### 2.5.3.2. Dénombrement des germes aérobies totaux

La procédure de dénombrement des germes est la même pour les matières premières et les produit fini. (Ph.Eur, 2008).

- **Bactéries**

- Introduire dans deux boites 1ml de l'échantillon préparé (Dilution  $10^{-1}$ ).
- Couler 15 ml à 20 ml d'un milieu gélosé adapté à la culture des bactéries (Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja), après l'avoir liquéfié à  $100^{\circ}\text{C}$  et refroidi à une température ne dépassant pas  $45^{\circ}\text{C}$ .
- Faire un mouvement sous forme de huit(8).
- Incuber à  $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  pendant 5 jours, et faire une lecture à 48h.

- **Levures et moisissures**

- Introduire dans deux boites 1ml de l'échantillon préparé (Dilution  $10^{-1}$ ).
- Couler 15 ml à 20 ml d'un milieu gélosé adapté à la culture des levures et moisissures (Milieu Sabouraud-déxtrosé- gélosé), après l'avoir liquéfié à  $100^{\circ}\text{C}$  et refroidi à  $45^{\circ}\text{C}$ .
- Faire un mouvement sous forme de huit(8).
- Incuber à  $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  pendant 7 jours.

- **Recherche d'Escherichia coli**

- Introduire 10 ml de l'échantillon préparé dans 100 ml de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja.
- Homogénéiser et incuber à  $32,5 \pm 2,5$  °C pendant 24 h.
- Agiter le flacon incubé, puis transférer 1ml de son contenu pour ensemercer 100ml de milieu liquide de MacConkey.
- Incuber à  $43 \pm 1$  °C pendant 48 h.
- A partir du flacon incubé ; prélever une goutte à l'aide de pipette pasteur et ensemercer avec des stries deux boites de milieu gélosé de MacConkey.
- Faire une boite de témoin de stérilité du milieu gélosé de MacConkey.
- Incuber à  $32,5 \pm 2,5$  °C pendant 72h.

- **Préparation du témoin stérile**

On coule dans une boite sans échantillon 15 à 20 ml de chaque milieu pour vérifier la stérilité des milieux.

#### **2.5.4. Contrôle de l'eau purifiée**

L'objectif est le contrôle de la qualité microbiologique de l'eau purifiée utilisée dans la fabrication et le nettoyage du matériel.

##### **2.5.4.1. Méthode de Prélèvement d'échantillon**

Un prélèvement d'eau décrit se faire au niveau du laboratoire de fabrication (le point 102).pour cela on laisse couler l'eau pendant environ une minute. On imbibe une gaze d'alcool et on nettoie le tuyau à l'intérieur et l'extérieure .ensuite on prend une paire de ciseaux sur quelle on enroule une gaze imbiber d'alcool et on la flamber à proximité du bout du tuyau afin d'assurer l'aseptisation du prélèvement.

Ensuite on ouvre 2 flacons on les flambe. On les remplit d'eau purifiée. On flambe une deuxième fois et on referme.

On les introduire dans une glacière et on les transporte rapidement au laboratoire d'analyse.

##### **2.5.4.2. Préparation des témoins**

- **Témoin de milieu de gélosé Trypticase soja agar**

On coule dans une boite sans échantillon 15 à 20 ml de milieu gélosé Trypticase soja agar pour vérifier la stérilité du milieu.

- **Témoin de l'eau stérile**

Pour vérifier la stérilité de l'eau stérile, on introduit 1ml d'eau stérile dans une boîte de pétri, ensuite on coule 15 à 20 ml de milieu Trypticase soja agar (TSA) puis fait un mouvement sous forme de huit.

#### **2.5.4.3. Test d'analyse de l'eau purifiée**

1. Introduire 1ml de l'échantillon d'eau purifiée à analyser dans 9ml d'eau stérile pour obtenir une dilution de  $10^{-1}$  de l'échantillon, puis transférer 1ml de cette dilution dans une boîte de pétri (boîte n°1), et 1ml dans 9ml d'eau stérile pour obtenir une dilution de  $10^{-2}$ .
2. transférer 1ml de la dilution  $10^{-2}$  dans une boîte de pétri (boîte n°2), et 1ml dans 9 ml d'eau physiologique pour obtenir une dilution de  $10^{-3}$ .
3. transférer 1ml de la dilution  $10^{-3}$  dans une boîte de pétri (boîte n°3).
4. Couler dans chaque boîte de pétri 15 à 20ml de milieu Trypticase soja agar puis faire un mouvement sous forme de huit. **(Ph.Eur, 2008).**

#### **2.5.4.4. Incubation**

Les boîtes (témoins et échantillons) sont incubées à  $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  pendant 5 jours avec une lecture à 48h. **(Ph.Eur, 2008).**

#### **2.5.4.5. Dénombrement**

On retire les boîtes de pétri de l'incubateur, on fait la moyenne entre les deux essais pratiqués avec la même dilution et on multiplie le nombre de colonies par l'inverse de cette dilution pour avoir le nombre de bactéries. **(Ph.Eur, 2008).**



# Chapitre 3: Résultats et discussions

### 3.1. Evaluation physique et chimique

Afin de prouver une bonne évaluation de l'aspect microbiologique en industrie pharmaceutique : bioévaluation, on a profité durant le stage de participer à l'évaluation physicochimique des mêmes points à contrôler s'agissant de matières premières ou de produits finis.

#### 3.1.1. Contrôle de l'eau de rinçage

##### 3.1.1.1. Conductivité

Les mesures de la conductivité sont données dans le tableau ci-dessous pour les deux tests 1 et 2 outil nettoyé (cuve DV1).

**Tableau 13:** Mesure de la conductivité de l'eau de rinçage.

		C ( $\mu\text{s/cm}$ )	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	Norme	Résultat
Test 1	Eau purifié	13.34	25.00	$\leq 5.2$	Non Conforme
	Eau de rinçage	11.72	25.00		
Test 2	Eau purifiée	3.4	25.00	$\leq 5.2$	Conforme
	Eau de rinçage	5.2	25.00		

- **Test 1 (outil nettoyé (cuve DV1)) :** La conductivité de l'eau purifiée étant supérieure à la conductivité de l'eau de rinçage suppose une mauvaise manipulation dans les prélèvements qui nous ont été transmis ou la cuve contient des traces de molécules antistatiques comme le stéarate de magnésium qui captent les ions.

Ces résultats d'analyse ne sont donc pas conformes à la norme pharmacopée européenne version en vigueur.

- **Test 2 (outil nettoyé (cuve DV1)) :** D'après ces résultats, nous constatons que la conductivité de l'eau de rinçage est proche de celle de l'eau purifiée.

##### 3.1.1.2. Spectre UV-Visible

Le résultat de l'étude de l'UV de l'eau de rinçage de la cuve nettoyée est représenté sur les courbes ci-dessous pour le test 1 (**Figure 13**) et test 2 (**Figure 14**).

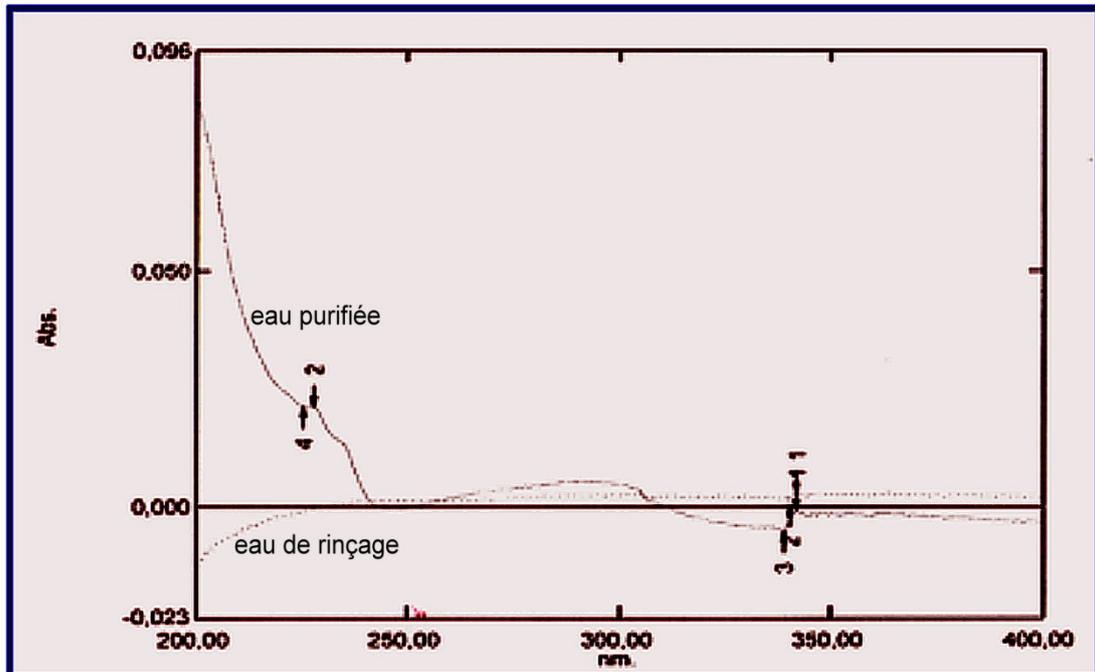


Figure 13: Spectre de l'UV de l'eau de rinçage test 1

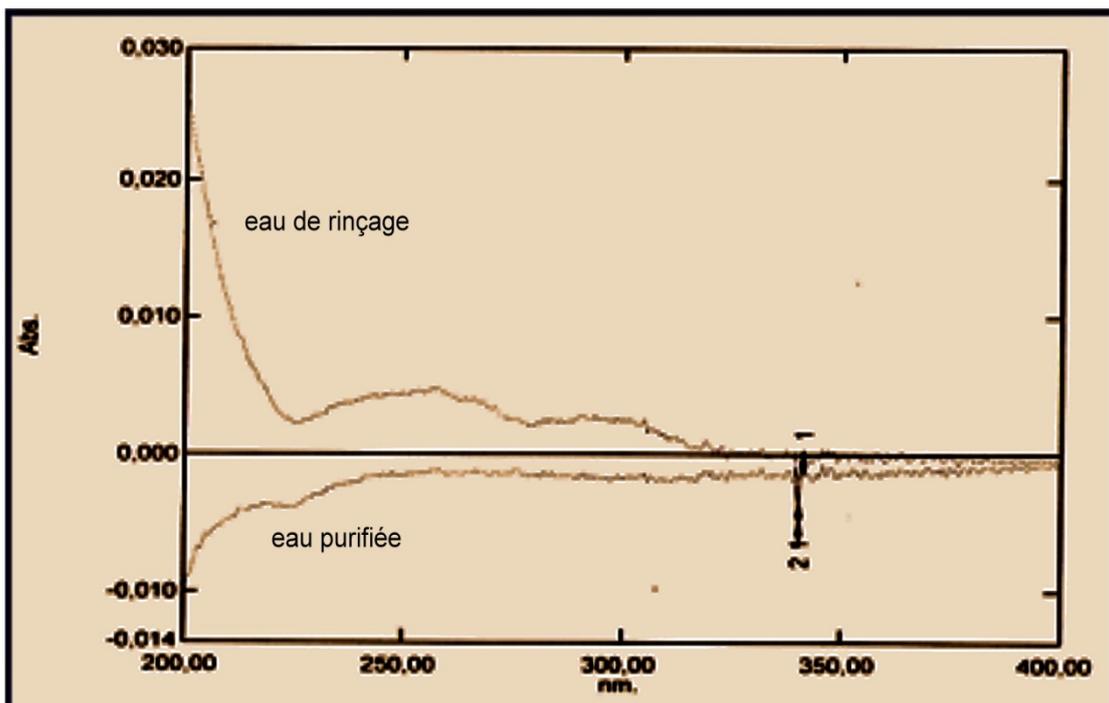


Figure 14: Courbes d'absorbance de l'UV (test 2)

- **Test 1:** Les courbes d'absorbance de l'UV de l'eau purifiée et de l'eau de rinçage n'étant pas superposables et la différence d'absorbance dépassant 0.05 permettent de conclure à un mauvais nettoyage.

D'après les résultats de la conductivité et de l'absorbance non conformes, il a été donc décidé de procéder à une nouvelle manipulation d'analyse.

- **Test 2:** La différence d'absorbance de l'UV de l'eau purifiée et de l'eau de rinçage étant inférieure à 0.05, la manipulation de nettoyage est acceptable.

D'après les résultats de la conductivité et de l'absorbance on peut conclure que le nettoyage de la cuve DV1 est dans les normes.

### 3.1.2. Contrôle et validation de la durée de vie de l'eau purifiée

Afin de déterminer la durée de vie de l'eau purifiée, 3 prélèvements ont été placés dans des conditions différentes, température ambiante, température ambiante à l'abri de la lumière et température réfrigérante. Des mesures de conductivité et de pH ainsi que des analyses d'acidité, d'alcalinité, de chlorure et de substances oxydables ont été réalisées pendant 5 jours.

#### 3.1.2.1. Température ambiante

Les résultats d'analyses des différents tests sont répertoriés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 14 :** Analyse des différents tests

Test	Norme		Résultat	Conformité
	Conformité	Non-conformité		
<b>Acidité</b>	Couleur jaune du réactif	couleur rouge	Aucun changement au 5 <sup>ème</sup> jour	conforme pendant les 5 jours
<b>Alcalinité</b>	Couleur vert clair du réactif	couleur bleue	Aucun changement de couleur (vert clair)	conforme pendant les 5 jours
<b>Substance Oxydable</b>	Légèrement rose	Transparent	Aucun changement de couleur (rose)	conforme pendant les 5 jours
<b>Chlorure</b>	Pas de précipité blanc	Précipité blanc	Pas de précipité blanc	conforme pendant les 5 jours

- **PH**

Les mesures du pH sont consignées dans le tableau suivant :

**Tableau 15:** Suivi de la mesure du pH

Date d'analyse	PH	température	Norme	Conformité
16 07 2017	6.29	22.30 °C	5.5-8.5	Conforme
17 07 2017	5.74	23.30 °C		
18 07 2017	5.64	21.80 °C		
19 07 2017	6.13	25.00 °C		
20 07 2017	6.20	24.00 °C		

Selon ces valeurs, on note la conformité à la norme pharmacopée européenne (version en vigueur).

- **Conductivité**

Les résultats de la conductivité sont représentés dans le tableau ci-dessous.

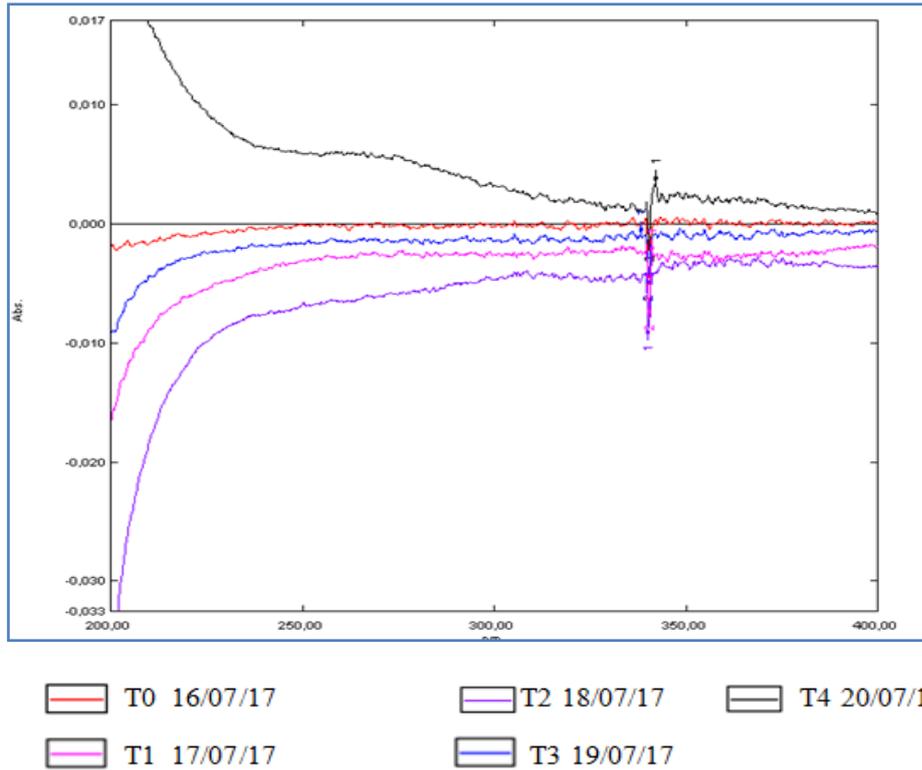
**Tableau 16:** Suivi de la conductivité

Date d'analyse	C (µS/cm)	température	norme	Conformité
16/ 07/ 2017	2.98	21.2 °C	≤ 4.3	Conforme
17/ 07/ 2017	3.07	22.8 °C	≤ 4.3	Conforme
18/ 07/ 2017	2.53	21.0 °C	≤ 4.3	Conforme
19 /07 /2017	2.79	24.8 °C	≤ 5.2	Conforme
20/ 07/ 2017	2.71	23.7 °C	≤ 5.2	Conforme

Les résultats de la conductivité sont conformes à la norme pharmacopée européenne version en vigueur.

- **Spectre UV-visible**

L'absorbance est représentée par les courbes suivantes :



**Figure 15:** Courbes d'absorbance de l'UV de l'eau à Température ambiante.

Au delà du 4<sup>ème</sup> jour l'absorbance est supérieure à zéro. Cela suppose une instabilité de l'eau purifiée.

### 3.1.2.2. Température ambiante à l'abri de la lumière

Les résultats d'analyse des différents tests sont consignés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau17:** Différents tests à l'abri de la lumière

Test	Norme		Résultat	Conformité
	conformité	Non-conformité		
<b>Acidité</b>	Couleur jaune du réactif	couleur rouge	Aucun changement de couleur (jaune)	conforme pendant les 5 jours
<b>Alcalinité</b>	Couleur vert clair du réactif	couleur bleue	Aucun changement de couleur (vert clair)	conforme pendant les 5 jours
<b>Substance Oxydable</b>	Légèrement rose	Transparent	Aucun changement de couleur (rose)	conforme pendant les 5 jours
<b>Chlorure</b>	Pas de précipité blanc	Précipité blanc	Pas de précipité blanc	conforme pendant les 5 jours

A l'abri de la lumière nous ne constatons aucun changement significatif de couleur dans tous les tests. Les analyses sont toutes conformes aux normes pharmacopée européenne version en vigueur.

- **PH**

Les résultats de PH sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 18 :** Mesures de ph à température à l'abri de la lumière

Date d'analyse	PH	Température (°C)	Norme	Conformité
16/07/2017	5.67	21.70°C	5.5 -8.5	Conforme
17/07/2017	5.84	23.40°C		
18/07/2017	5.65	23.00°C		
19/07/2017	5.40	25.00°C		
20/07/2017	6.60	24.00°C		

Les résultats de PH sont conformes à la norme pharmacopée européenne version en vigueur.

- **Conductivité**

Les mesures de la conductivité dans de l'eau à l'abri de la lumière sont données dans ce tableau.

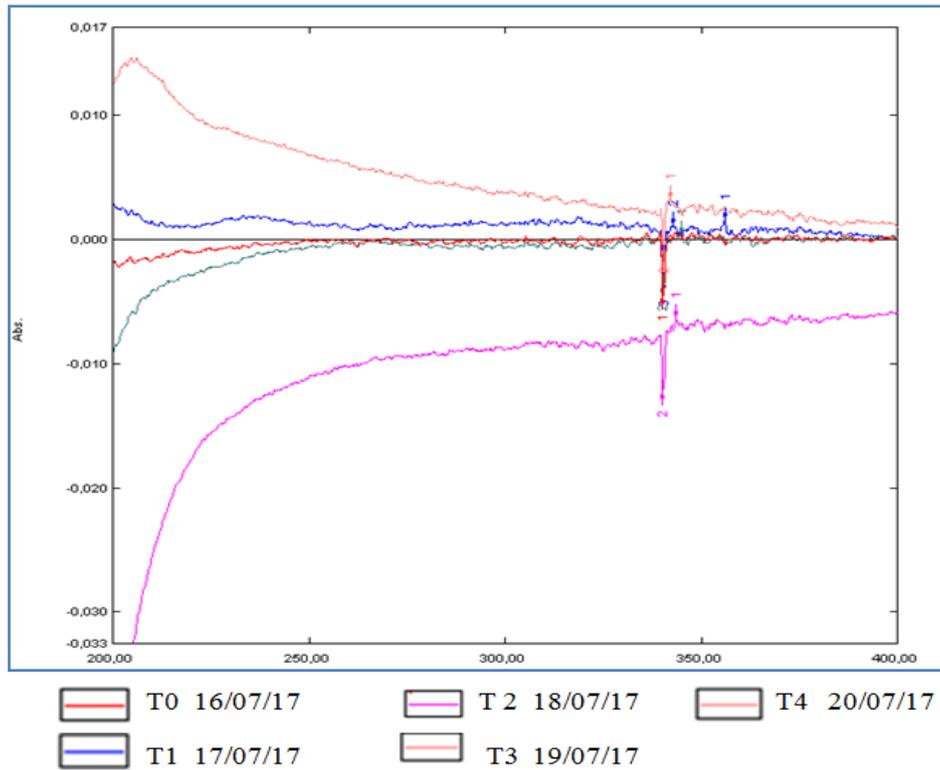
**Tableau 19 :** Les mesures de la conductivité de l'eau à l'abri de la lumière.

Date de mesure	C (µs/cm)	température	Norme	Conformité
16/07/2017	2.73	20.7°C	4.3 à 20°C 5.2 à 25°C	Conforme
17/07/2017	3.25	21.1°C		
18/07/2017	2.78	21.0°C		
19/07/2017	2.55	24.0°C		
20/07/2017	2.54	23.7°C		

L'eau à l'abri de la lumière conserve sa caractéristique de conductivité.

- **Spectre UV-Visible**

L'absorbance est représentée par les courbes suivantes :



**Figure 16:** Courbes d'absorbance de l'UV de l'eau à l'abri de la lumière

Le 1<sup>er</sup> jour on remarque une absorbance négligeable et au delà du 4<sup>ème</sup> jour l'absorbance est bien marquée. L'eau purifiée ne peut être conservée plus de 4 jours à l'abri de la lumière.

### 3.1.2.3. Température réfrigérante

Les résultats des différentes analyses sont représentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 20 :** Différentes analyses à température réfrigérante

Test	Norme		Résultat	Conformité
	conformité	Non-conformité		
<b>Acidité</b>	Couleur jaune du réactif	couleur rouge	Aucun changement de couleur (jaune)	conforme pendant les 5 jours
<b>Alcalinité</b>	Couleur vert clair du réactif	couleur bleue	Aucun changement de couleur (vert clair)	conforme pendant les 5 jours
<b>Substance Oxydable</b>	Légèrement rose	transparent	Aucun changement de couleur (rose)	conforme pendant les 5 jours
<b>Chlorure</b>	Pas de précipité blanc	Précipité blanc	Pas de précipité blanc	conforme pendant les 5 jours

Toutes les analyses sont conformes à la norme pharmacopée européenne version en vigueur.

- **PH**

Les mesures de pH à la température réfrigérante sont représentées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 21** : PH de l'eau à la température réfrigérante

Date d'analyse	PH	Température (°C)	Norme	Conformité
16/07/2017	5.65	20.40	5.5 -8.5	Conforme
17/07/2017	6.40	15.00		
18/07/2017	6.26	19.60		
19/07/2017	5.64	16.40		
20/07/2017	6.71	16.10		

On note une conformité à la norme pharmacopée européenne 6 des résultats du pH à la température réfrigérante.

- **Conductivité**

Les mesures de conductivité de l'eau à la température réfrigérantes ont donné les valeurs suivantes :

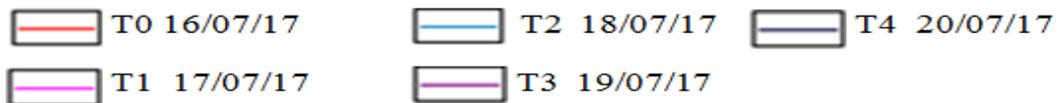
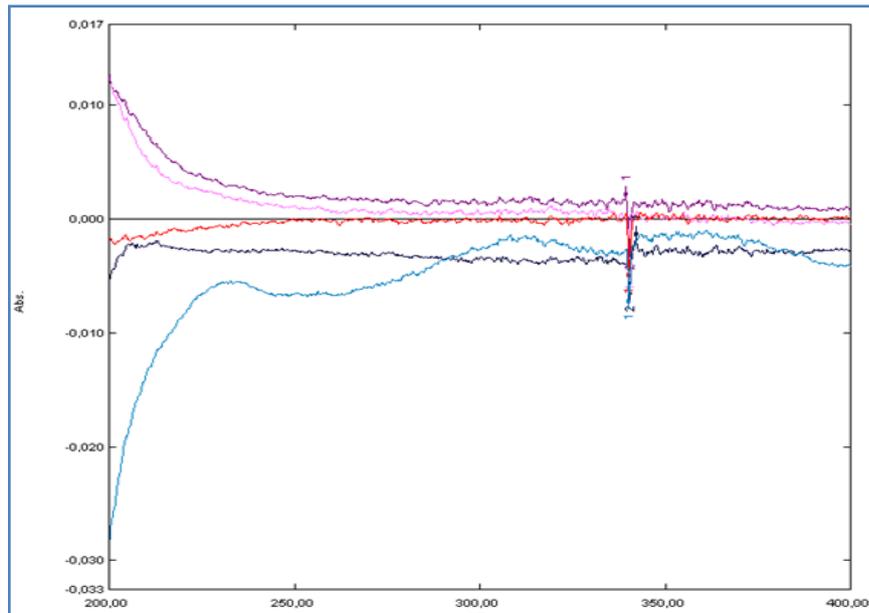
**Tableau 22** : Mesures de la conductivité de l'eau à la température réfrigérante

Date de mesure	C (µS/cm)	Température (°C)	Norme	Conformité
16/07/2017	2.46	19.3	≤ 4.3	Conforme
17/07/2017	2.07	15.9		
18/07/2017	2.32	19.5		
19/07/2017	2.18	20.2		
20/07/2017	1.87	19.1		

Les mesures de la conductivité de l'eau à la température réfrigérante sont conformes à la norme pharmacopée européenne version en vigueur.

- **Spectre UV-visible**

Les mesures de l'absorbance de l'UV de l'eau à température réfrigérante est représentée par les courbes suivantes :



**Figure 17:** Absorbance de l'UV de l'eau à température réfrigérante

Les courbes T1 et T2 montrent une légère absorbance qui reste, toutefois, négligeable. Nous pouvons dire qu'à température réfrigérante, l'eau purifiée est conservable pendant 5 jours.

D'après les résultats des analyses pendant la période de suivi, nous pouvons conclure que la stabilité de l'eau purifiée est valide pour 04 jours que cela soit à Température ambiante en présence de lumière ou à température ambiante à l'abri de la lumière et 05 jours à température réfrigérantes..

### 3.1.3. Contrôle de la matière première

Durant le stage on a pu participer à l'analyse des matières citées ci-dessous :

#### 3.1.3.1. Lactose monohydrate

Les résultats d'analyse du lactose monohydrate sont représentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 23:** Aspect, solubilité et acidité du lactose monohydrate

Analyse	Norme	Résultat
Aspect	poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche.	Poudre blanche ou sensiblement blanche, très fine, légère, onctueuse au toucher
solubilité	facilement mais lentement soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent.	conforme
Acidité ou alcalinité	Le virage de l'indicateur au rouge ne nécessite pas plus de 0,3 ml d'acide chlorhydrique 0,01 M.	0.2 ml

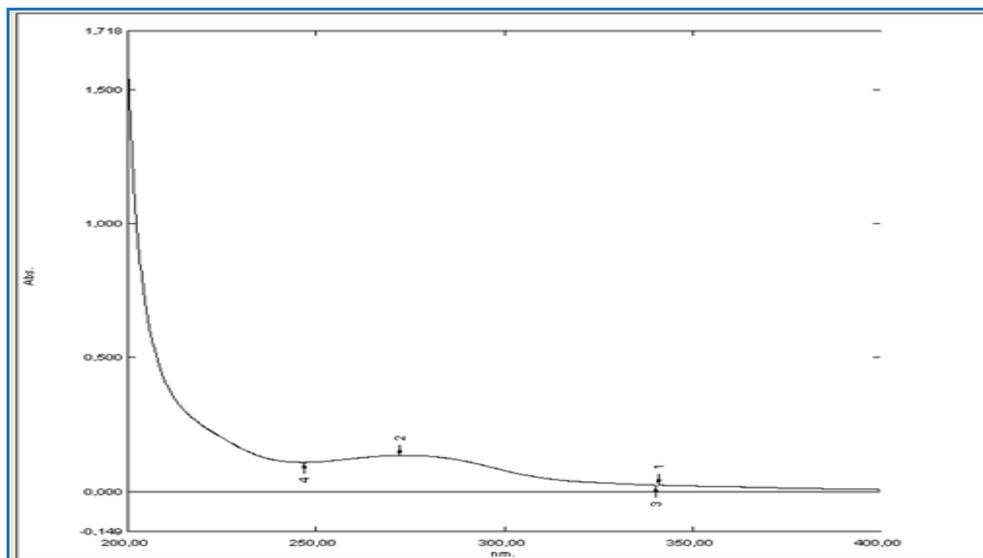
L'observation visuelle de l'aspect de lactose monohydrate a montré que la poudre est cristalline de couleur blanche. Cela veut dire que notre matière première est propre parce qu'elle garde son aspect intact.

Les résultats de test de solubilité ont montré que le lactose monohydrate est facilement mais lentement soluble dans l'eau et pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96%.

- **Spectre UV-Visible**

- ✓ **Solution (a)**

Les résultats de l'absorbance sont représentés par la courbe et le tableau ci-dessous :



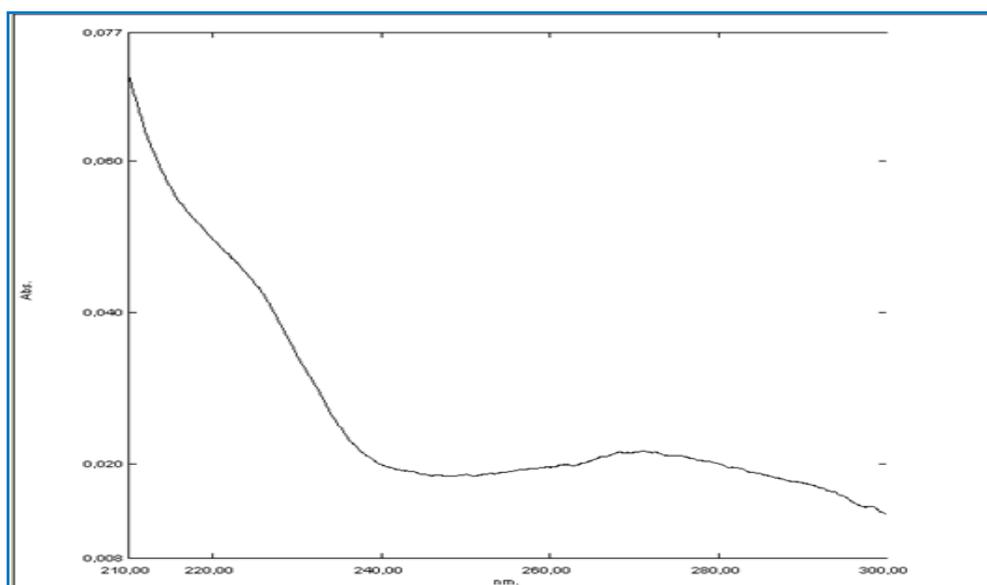
**Figure 18:** Courbe d'absorbance la solution (a)

**Tableau 24:** Résultat de l'absorbance solution (a) à la longueur d'onde 400 nm

Longueur d'onde (nm)	Absorbance	
	Norme	Résultat
400	0.04	0.007

✓ **Solution (b)**

Les résultats de l'absorbance sont représentés par la courbe et le tableau suivants :



**Figure 19:** Courbe d'absorbance de la solution(b)

**Tableau 25:** Absorbance de la solution (b) à la longueur d'onde 210-300 nm

Longueur d'onde (nm)	Norme	Résultat
210	maximum 0,25	0.071
215		0.057
220		0.050
270	0.07	0.022
280		0.020
300		0.013

L'aspect, l'acidité ou alcalinité, la solubilité et le spectre UV nous confirment l'identification de lactose monohydrate.

### 3.1.3.2. Stéarate de magnésium

Les résultats d'analyse de stéarate de magnésium sont donnés comme suit (**Tableau 26**):

**Tableau 26:** Aspect, solubilité et acidité de stéarate de magnésium

Analyse	Norme	Résultat
<b>Aspect</b>	Poudre blanche ou sensiblement blanche, très fine, légère, onctueuse au toucher.	Poudre blanche ou sensiblement blanche, très fine, légère, onctueuse au toucher
<b>Solubilité</b>	Pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol.	Conforme
<b>Acidité ou alcalinité</b>	Le virage de l'indicateur bleu de bromothymol R1 ne nécessite pas plus 0.5ml d'acide chlorhydrique 0.01	0.1ml

L'aspect, l'acidité ou alcalinité et la solubilité confirment la conformité de stéarate de magnésium.

## 3.2. Evaluation microbiologique

### 3.2.1. Contrôle microbiologique de l'air

Les résultats des dénombrements des germes aérobies totaux dans l'air de chaque zone de fabrication sont représentés par les histogrammes ci contres :

Zone1

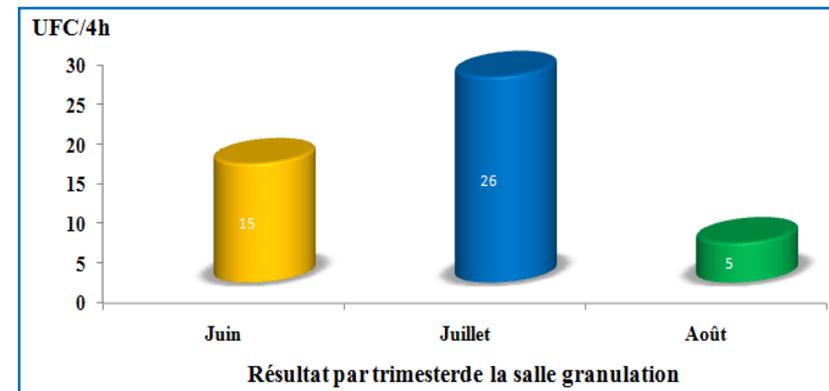
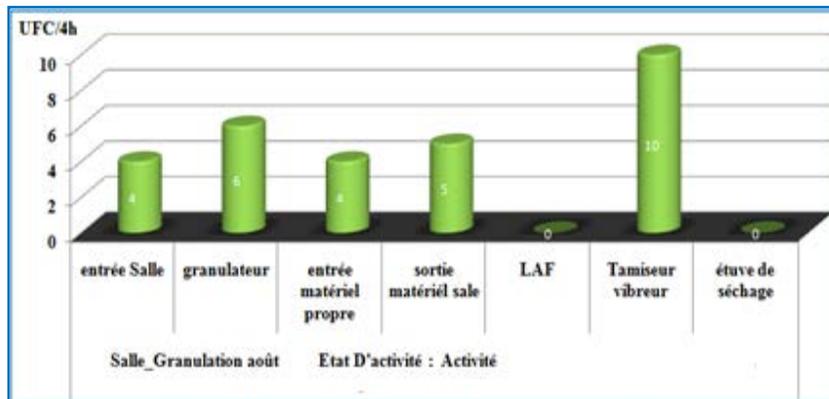
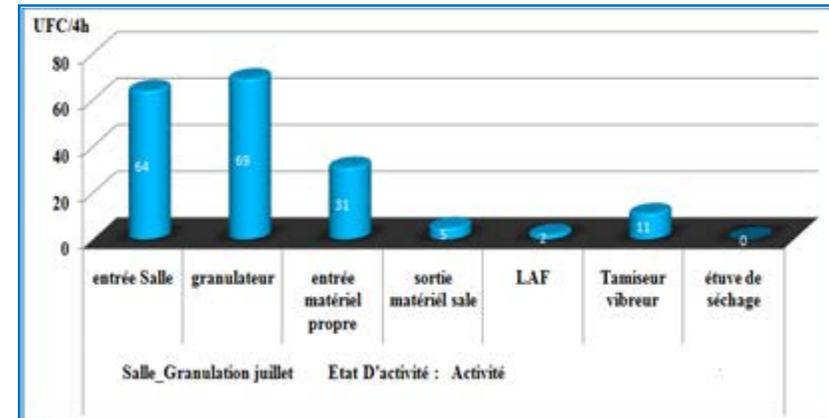
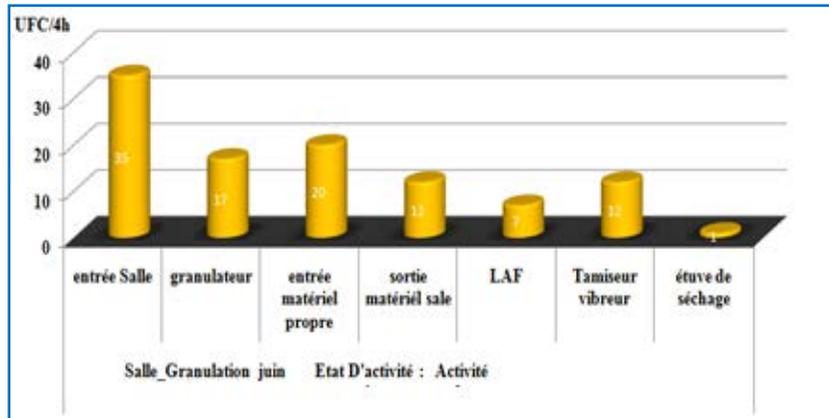


Figure 20 : Histogrammes de la salle de granulation

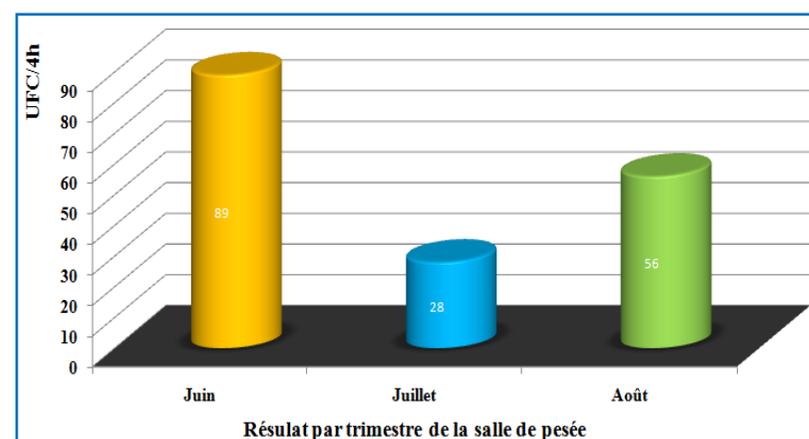
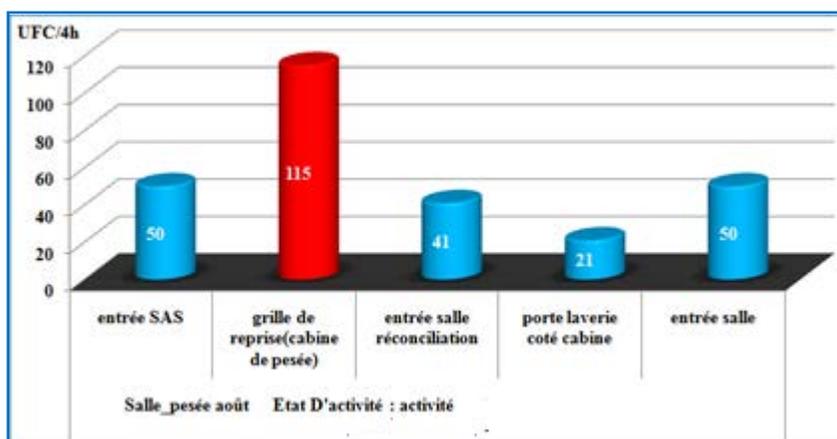
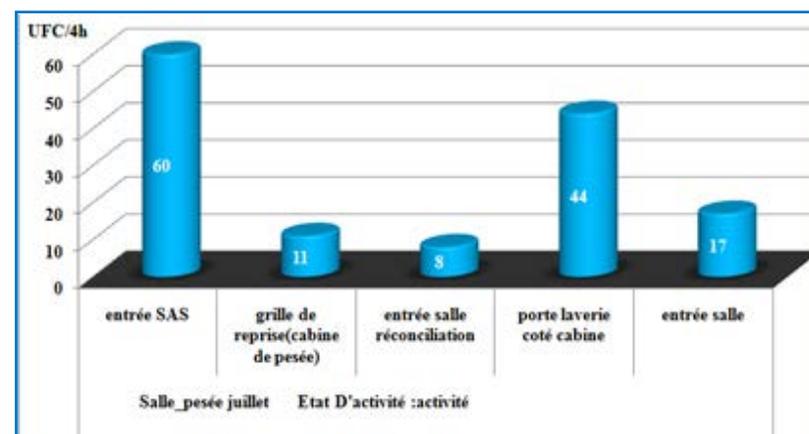
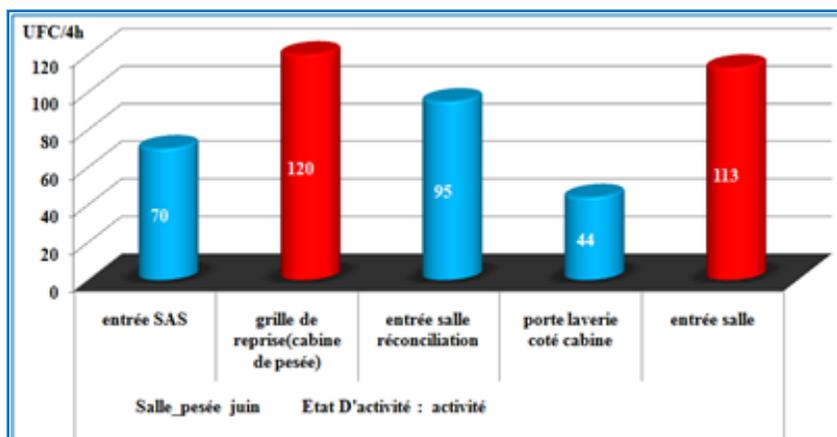


Figure 21 : Histogrammes de la salle de pesée

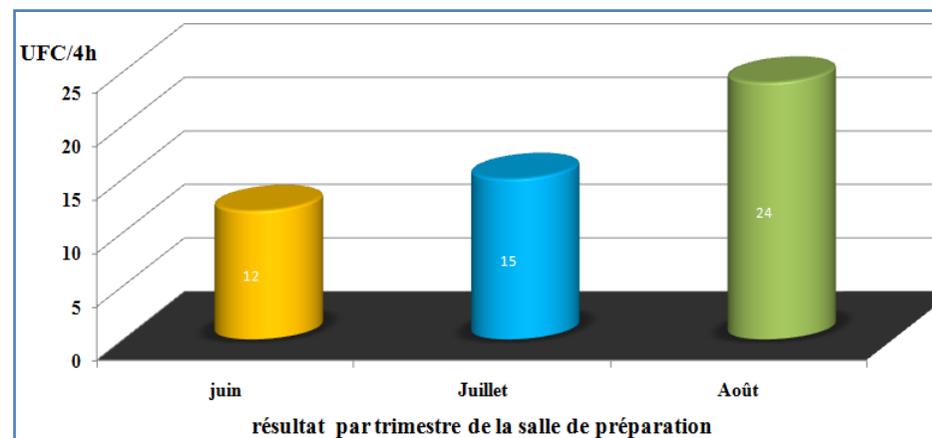
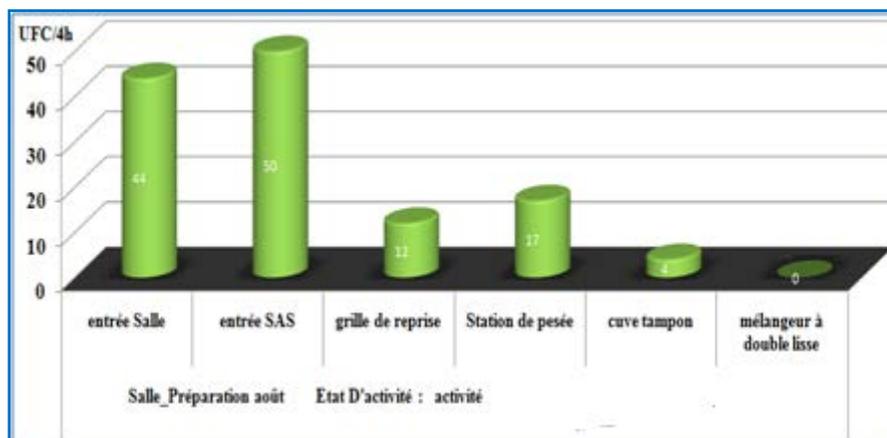
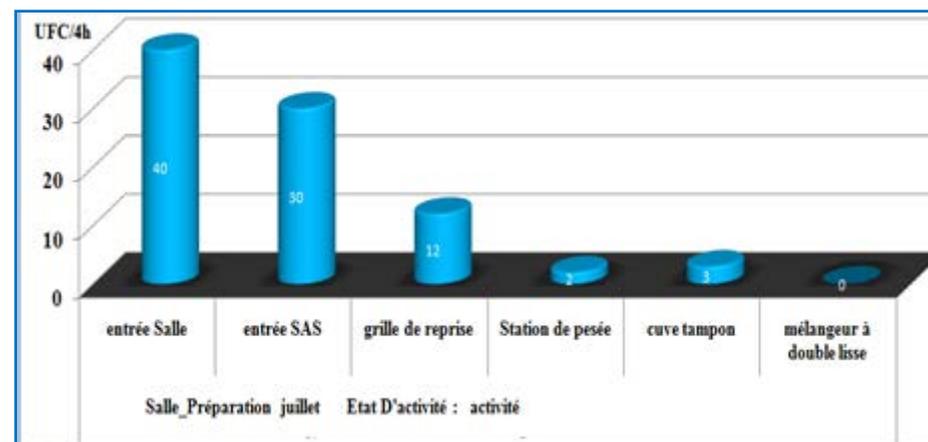
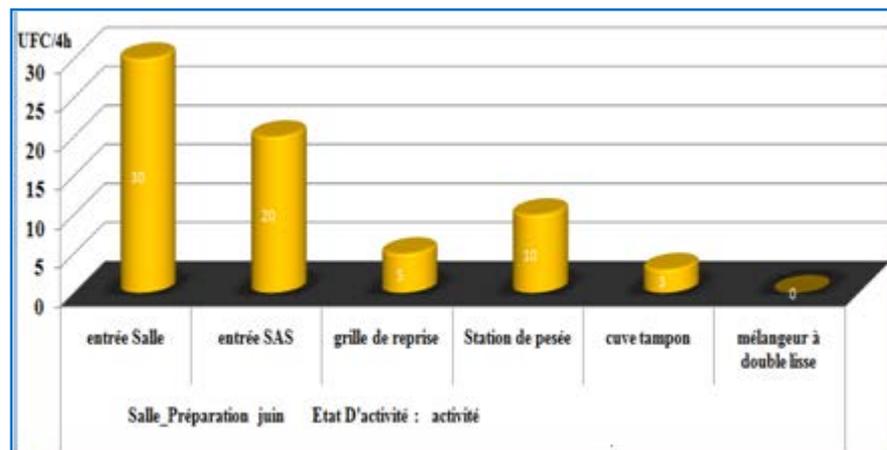


Figure 22 : Histogrammes de la salle de préparation

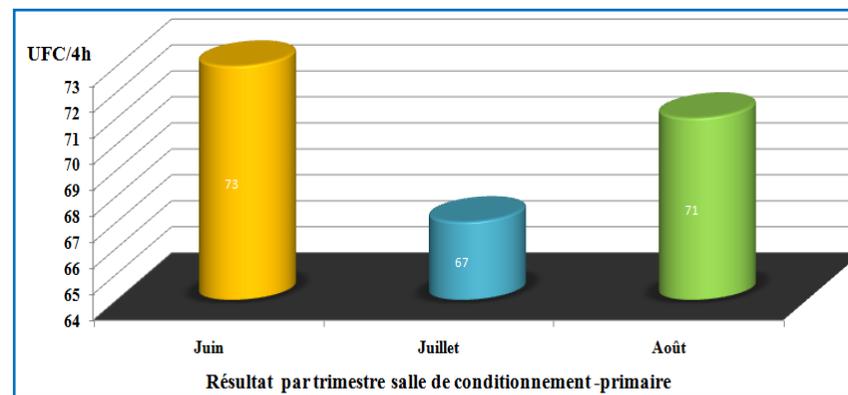
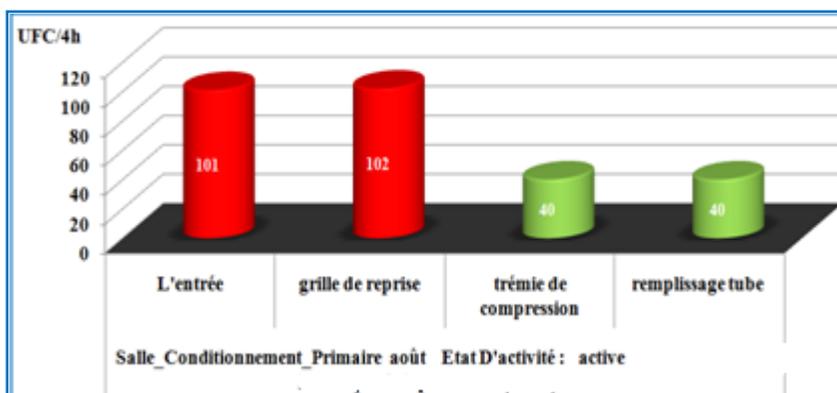
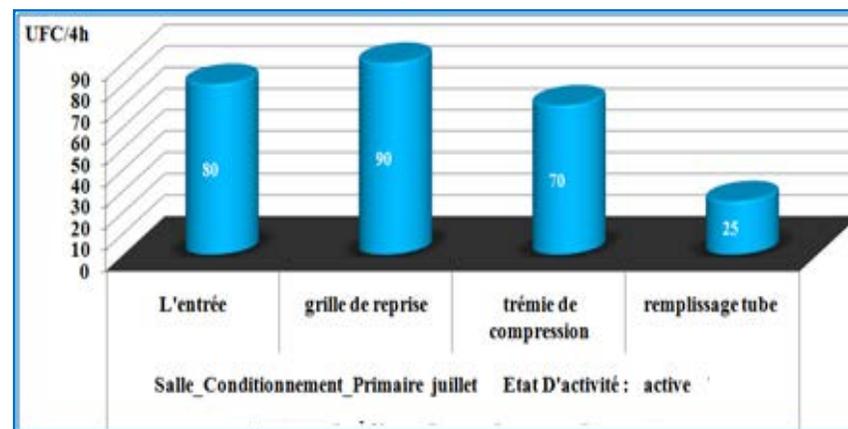
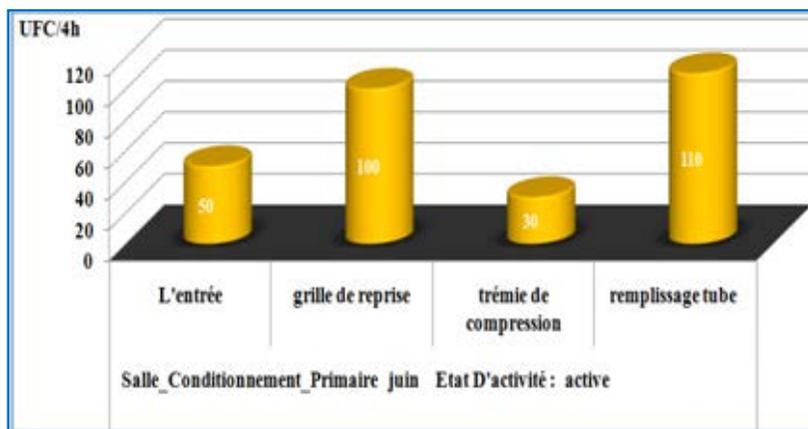


Figure 23 : Histogrammes de la salle de conditionnement primaire

Zone2 :

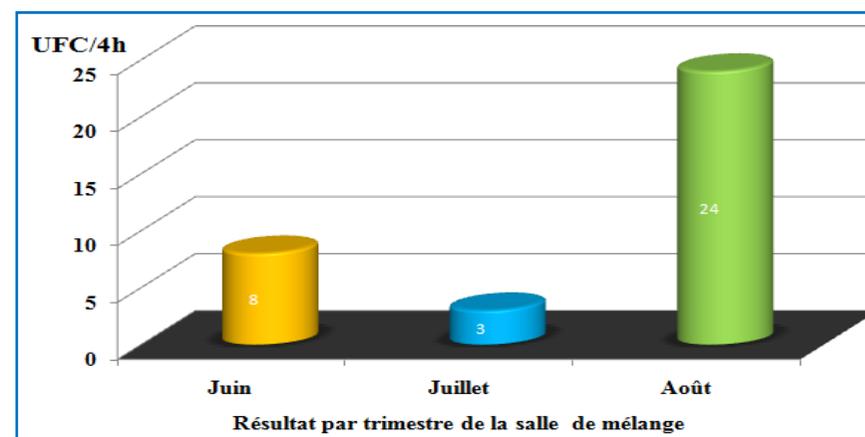
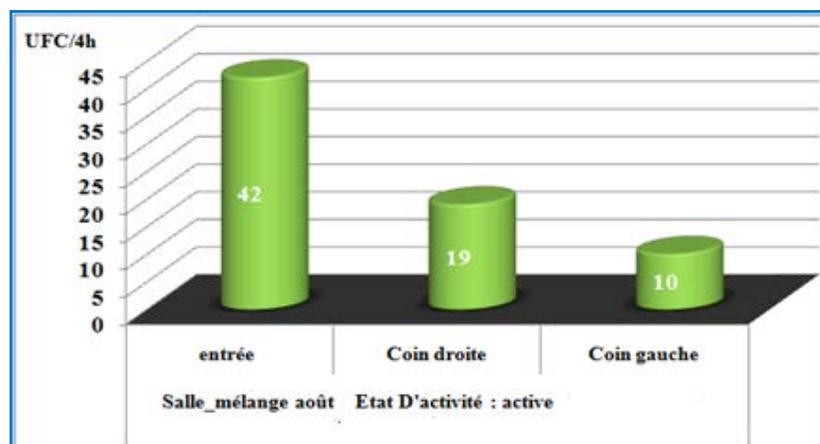
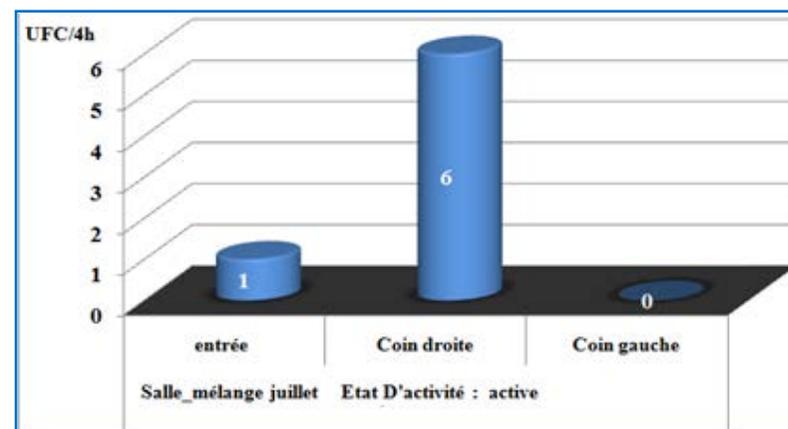
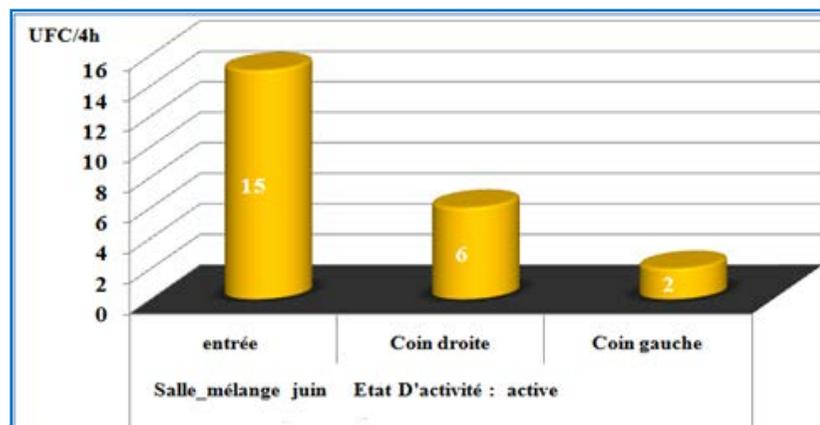


Figure 24 : Histogrammes de la salle mélange

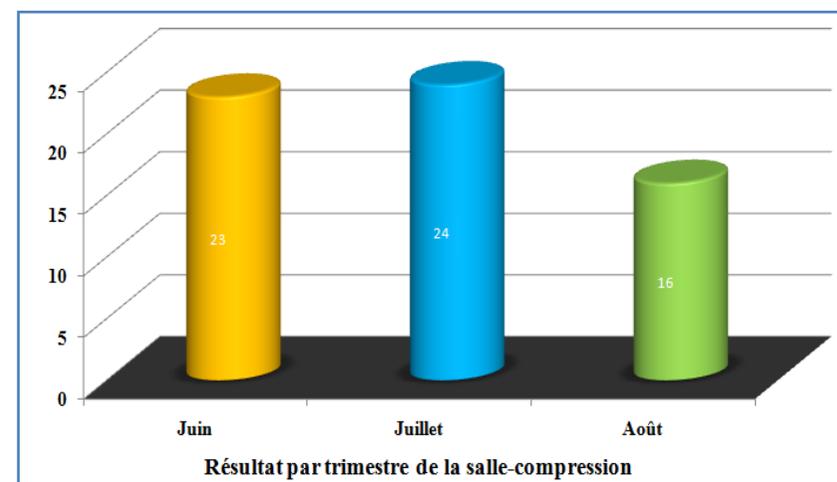
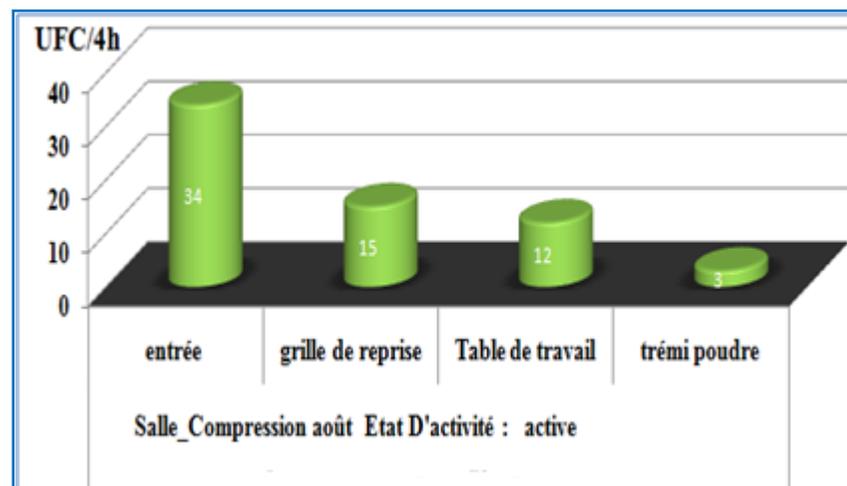
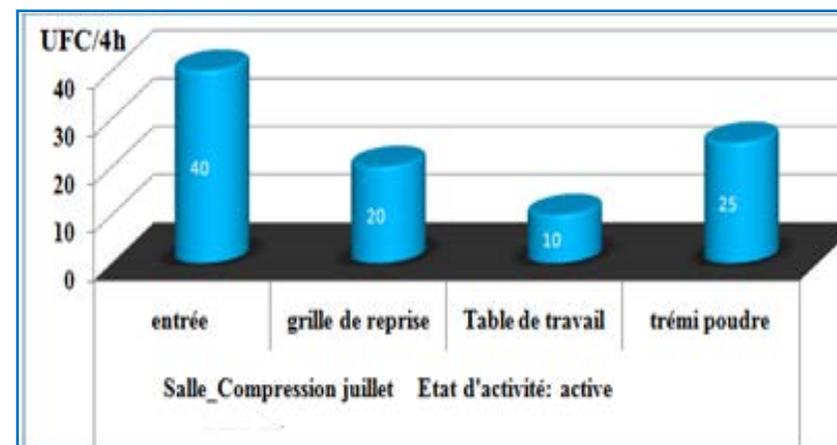
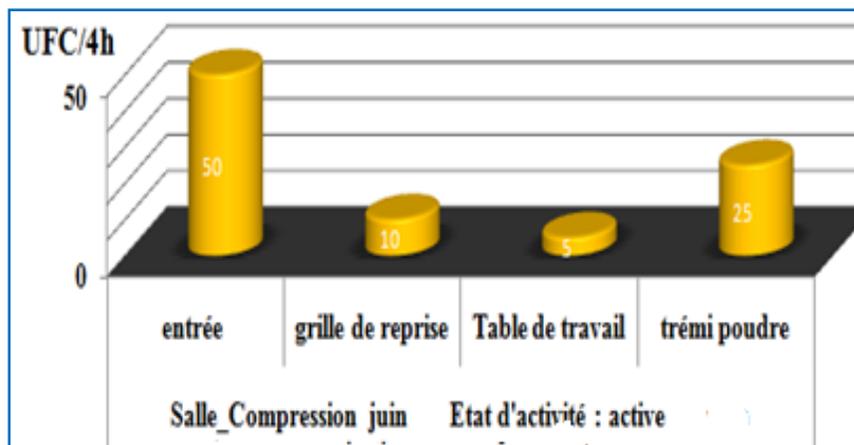


Figure 25 : Histogrammes de la salle de compression.

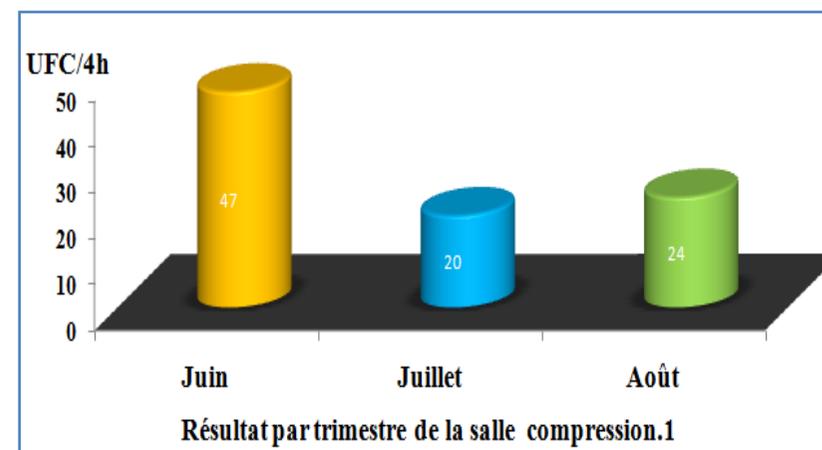
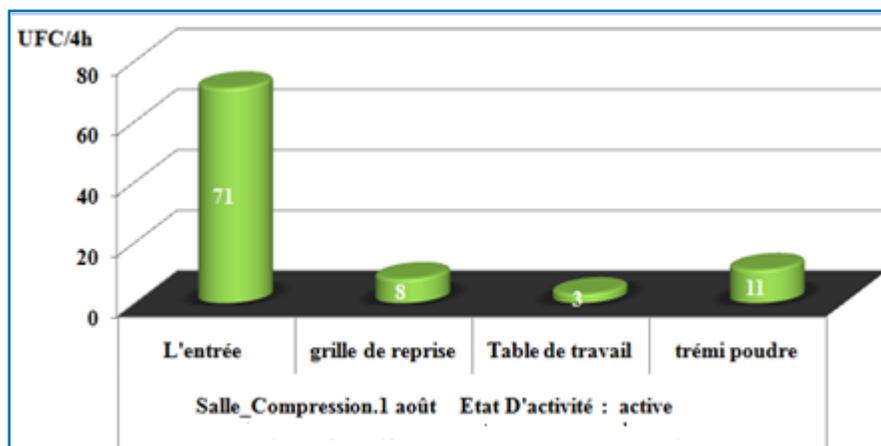
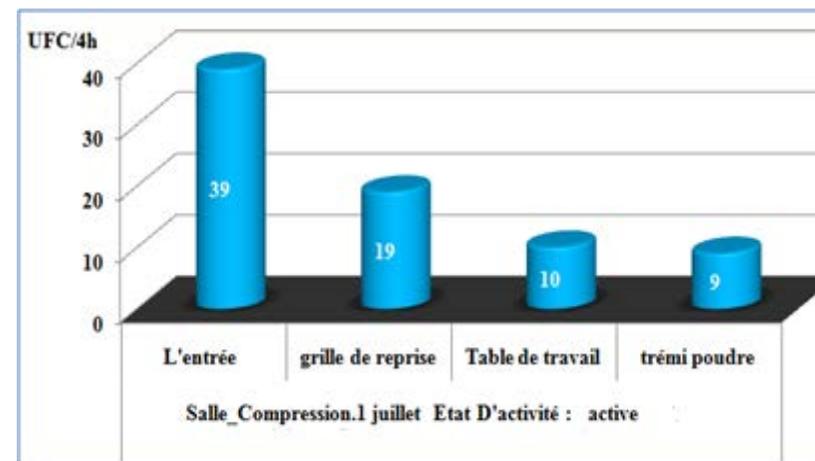
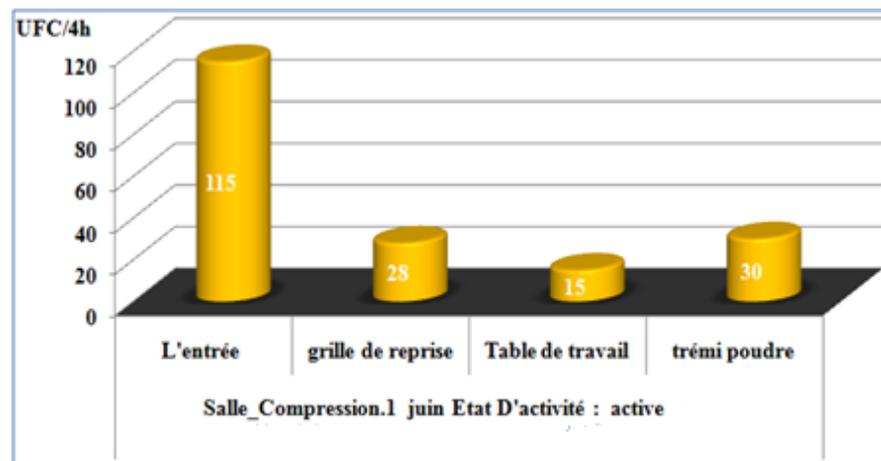


Figure 26 : Histogrammes de la salle de compression.1

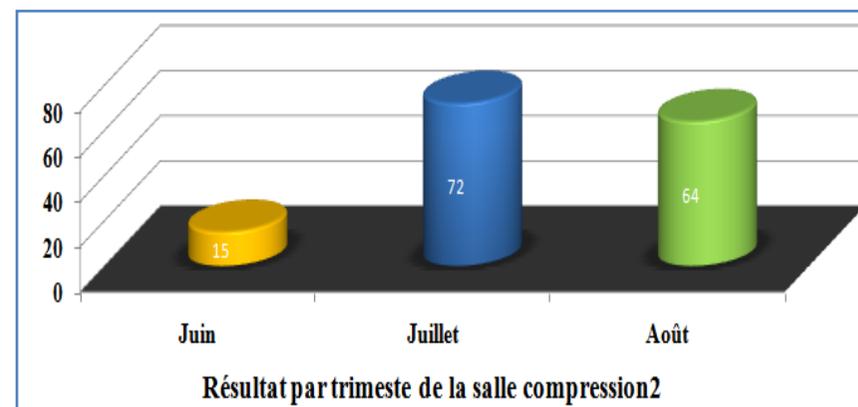
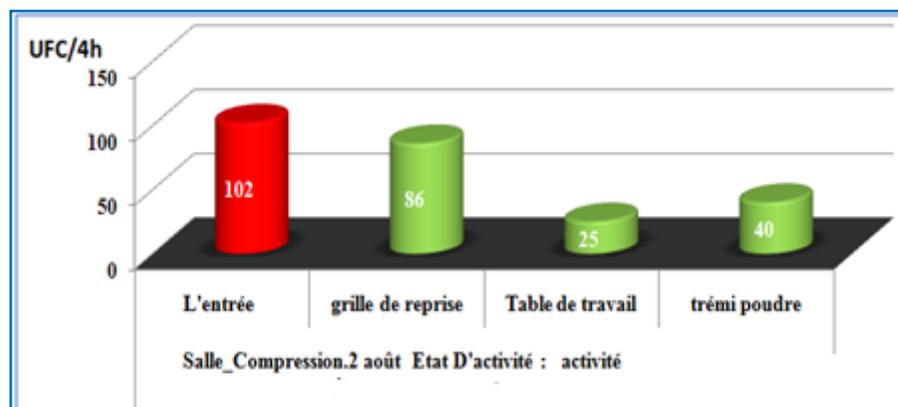
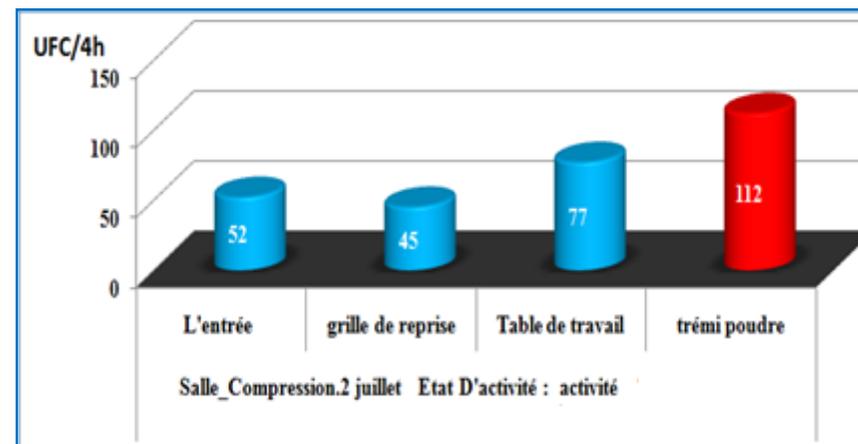
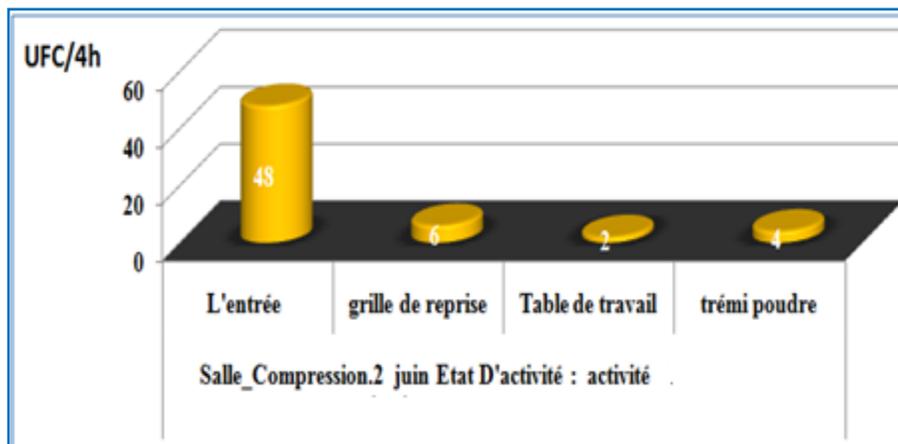


Figure 27 : Histogrammes de la salle compression.2

Zone 3 :

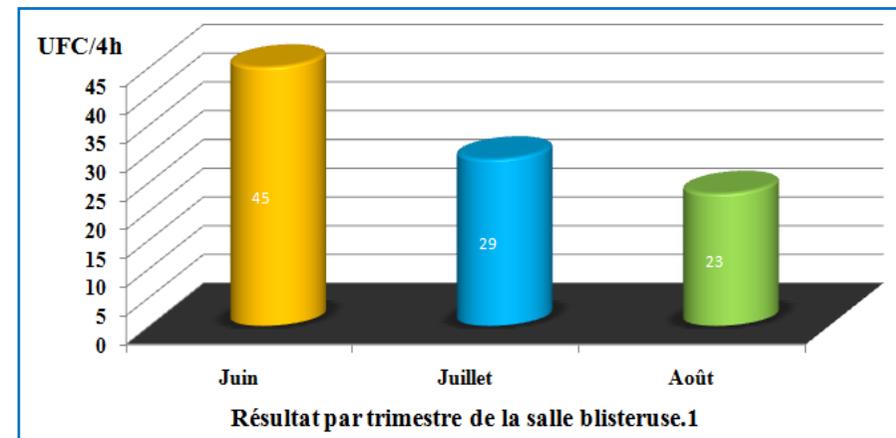
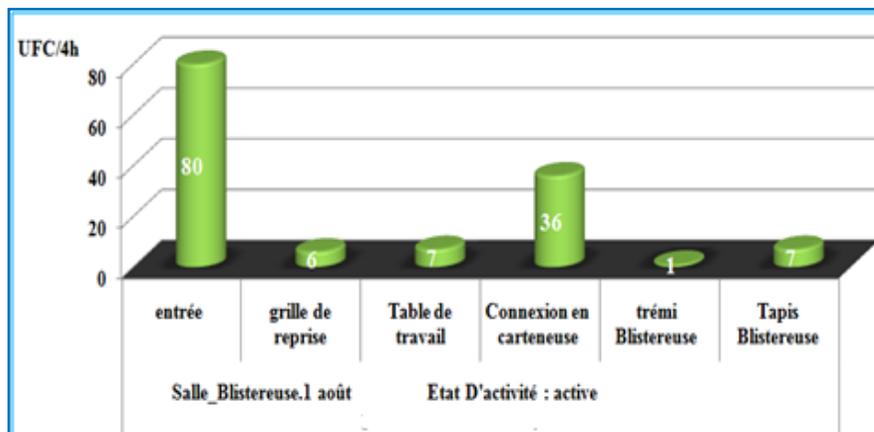
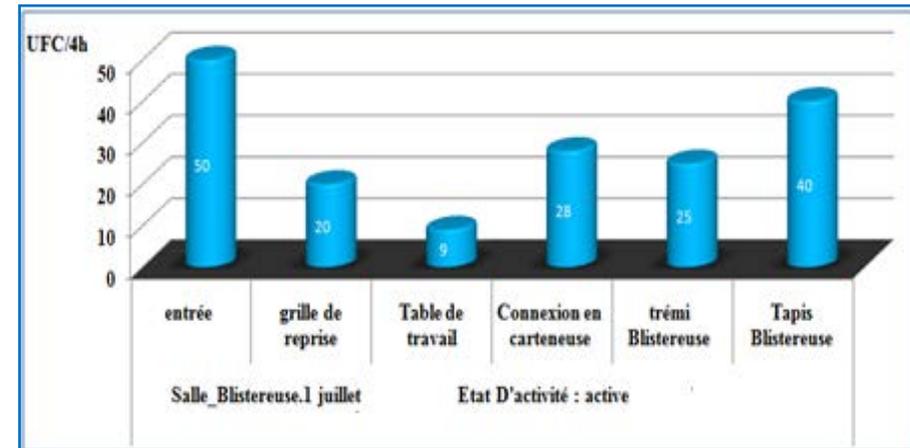
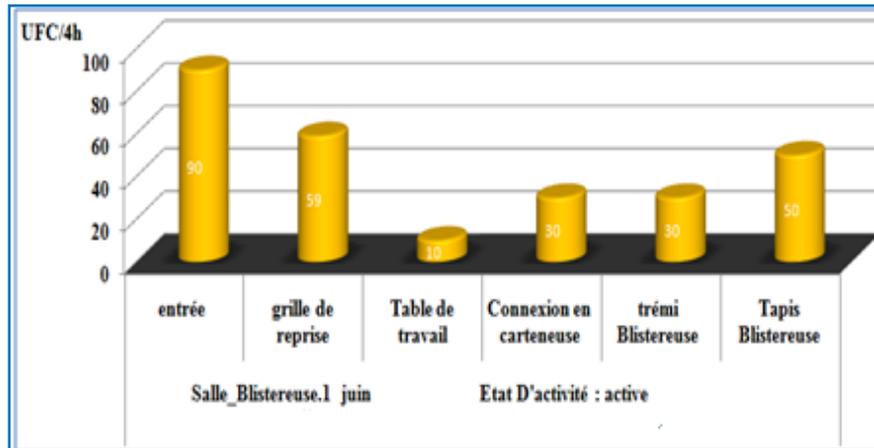


Figure 28 : Histogrammes de la salle blistereuse.1

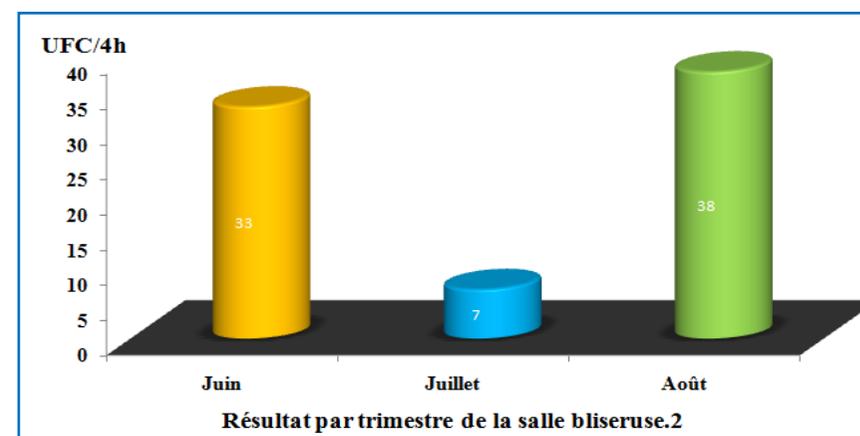
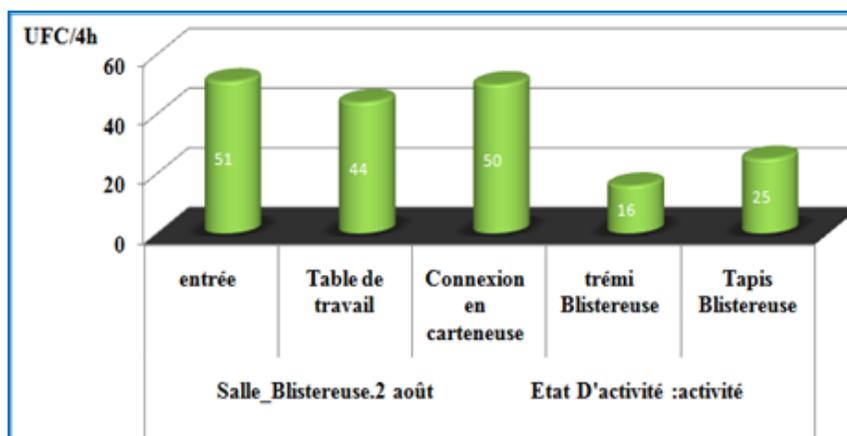
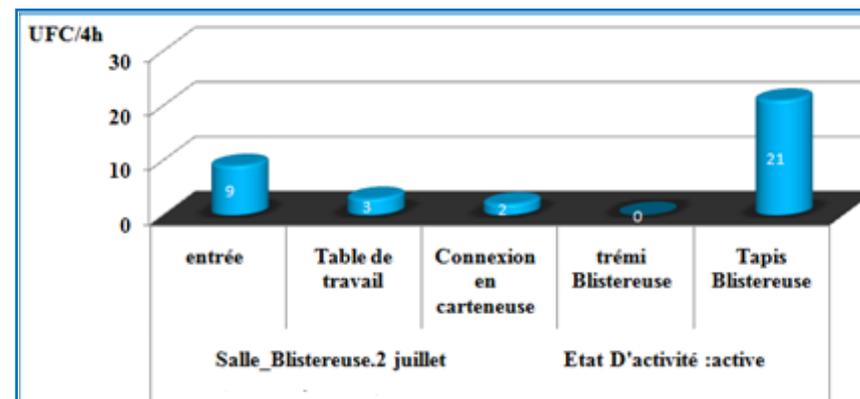
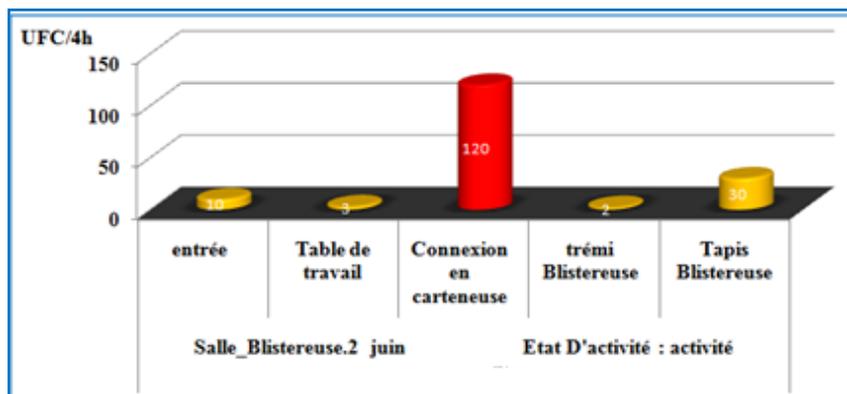


Figure 29 : Histogrammes de la salle blistèreuse.2

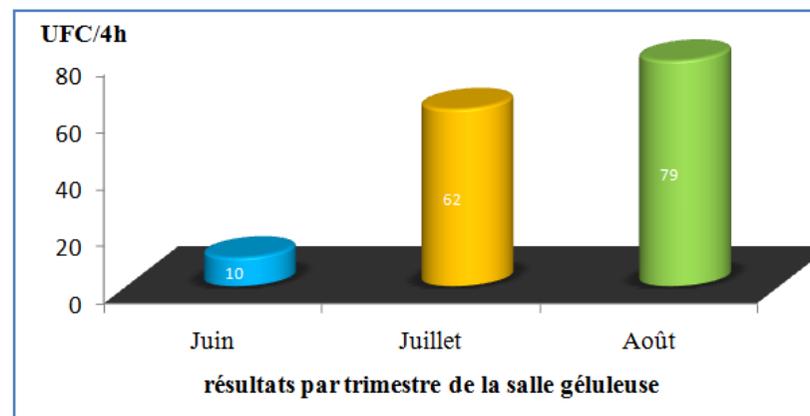
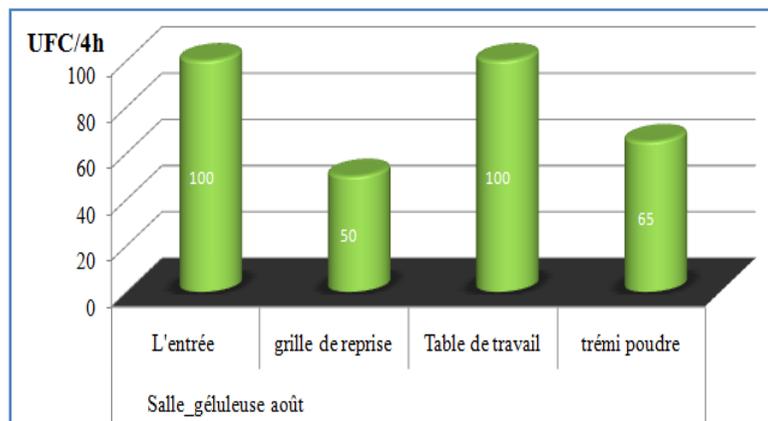
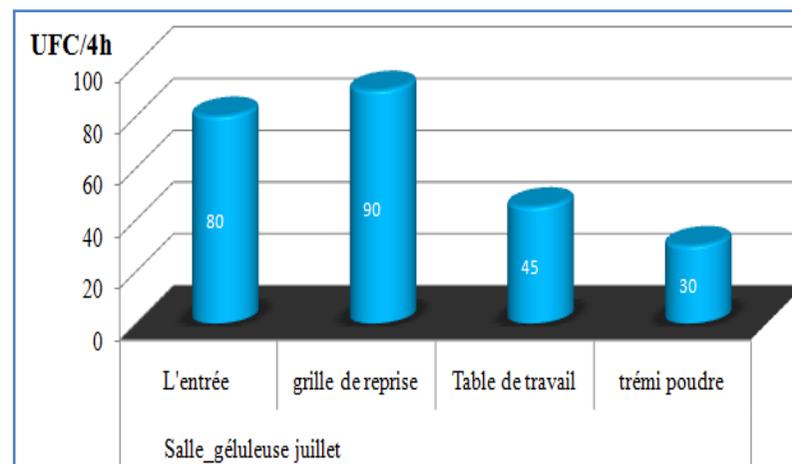
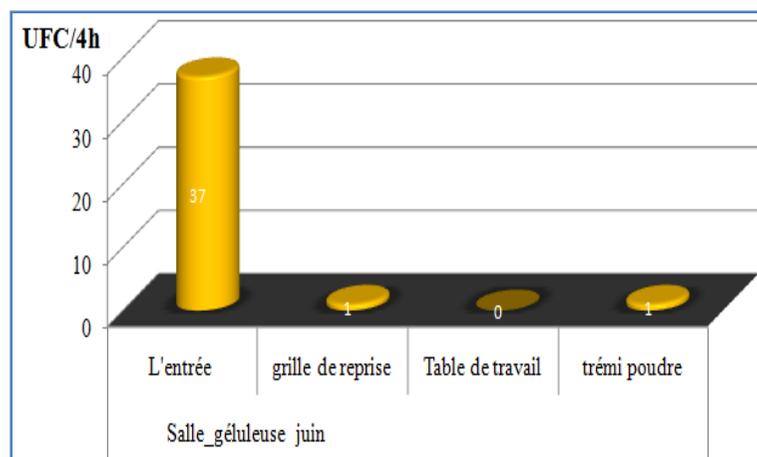


Figure 30 : Histogrammes de la salle géluleuse.

Toutes les salles des zones de production appartiennent à la classe D.

Les résultats montrent que dans certaines salles il ya des points ou le nombre de colonies dépasse 100UFC/4h. Ces points sont jugés non critiques et ne sont pas directement en contact ou à proximité des espaces de manipulation du produit.

Les résultats des dénombrements sont donc conformes à la norme BPF. La qualité des produits fabriqués est donc assurée

### 3.2.2. Matière première (Stéarate de magnésium)

Les résultats de dénombrement sont donnés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 27 :** Résultats de dénombrement de Matière première « stéarate de magnésium »

Germes	Essais (UFC/ml)			Limite d'acceptation UFC/g
	1	2	moyenne	
bactérie	00	00	00	$\leq 10^3$
Levure et moisissure	00	00	00	$\leq 10^2$
E. coli	00	00	00	Absence

Les résultats sont conformes à la norme pharmacopée européenne en vigueur.

### 3.2.3. Eau purifiée

Les résultats de dénombrement sont donnés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 28 :** Résultats d'analyse microbiologique d'eau purifié

	Les dilutions	Essais (UFC/ml)			Limite d'acceptation UFC/ml
		1	2	moyenne	
Bactérie	$10^{-1}$	00	00	00	$\leq 10^2$
	$10^{-2}$	00	00	00	
	$10^{-3}$	00	00	00	

Les résultats sont conformes à la norme pharmacopée européenne version en vigueur.

### 3.2.4. Produit fini (Zetirec)

Les résultats de dénombrement des germes dans le produit fini zetirec sont représentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 29** : Résultats d'analyse du produit fini Zetirec

Germes	Essais (UFC/ml)			Limite d'acceptation UFC/ml
	1	2	moyenne	
Bactéries	00	00	00	$\leq 10^2$
Levure et moisissure	00	00	00	$\leq 10^1$
E. coli	00	00	00	Absence

Les résultats sont conformes à la norme pharmacopée européenne version en vigueur.



**conclusion**

### Conclusion

Un médicament est un produit dont la composition possède des propriétés curatives et préventives à l'égard des maladies. Il doit répondre à cinq exigences fondamentales : qualité, efficacité, pureté, identité et sûreté. Il ne peut être mis sur le marché.

L'objectif de l'étude est de prouver qu'une efficace évaluation de l'aspect physicochimique et surtout microbiologique « bio évaluation » d'un médicament ou un constituant du système de fabrication et le contrôle dans l'industrie pharmaceutique « Laboratoire UPC » va garantir une production de la qualité requise en suivant les 5M (**M**ilieu air + nettoyage des locaux, **M**atériel : nettoyage des équipements, **M**atière : eau, matière première, produit fini etc....**M**ain d'œuvre : hygiène du personnel et respect d'habillement, l'ensemble doit être en conformité avec la **M**éthode : pour toute référence et documentation approuvée de travail)

Après l'exécution des protocoles de contrôle et de suivi, on a pu conclure :

- Les paramètres de contrôle microbiologique et physicochimique sont tous dans les normes de conformité.
- Les résultats obtenus du contrôle d'eau purifiée pour les 3 différentes conditions de conservation confirment une stabilité physicochimique de l'eau purifiée pendant 04 jours à température ambiante en présence ou en absence de lumière et 05 jours à température réfrigérante.
- Tout au long de la chaîne de production, le bon nettoyage a garanti la qualité du produit fabriqué.



# Résumé

## **Résumé**

L'étude est consacrée à l'évaluation microbiologique et physicochimique des vecteurs de contamination (l'eau purifiée, l'eau de rinçage, la matière première et le produit fini) dans l'industrie pharmaceutique.

Afin de garantir une qualité absolue du médicament, des tests sont réalisés tout au long de la chaîne de production, de la matière première au produit fini. Le contrôle microbiologique et physicochimique constitue une étape primordiale pour la libération d'un produit fini conforme aux spécifications préétabli.

La maîtrise des procédures de fabrication des médicaments nécessite une bonne préparation de l'environnement et du système, présentés par les **5M** : **M**ilieu, **M**atière, **M**ain d'œuvre, **M**atériel et **M**éthode.

**Mots clés** : Biocontamination, Aérobiocontamination, Stéarate de magnésium, Lactose monohydrate, Eau purifiée, Eau de rinçage, Pharmacopée.

### **Abstract:**

This study is dedicated to the biological and physicochemical evaluation of the vectors of contamination (purified water, rinse water, raw material, and final product) in the pharmaceutical industry.

To ensure an absolute quality of the medication, tests are carried out throughout the production chain from raw material to final product. The microbiological and physicochemical control is primordial step for the release of a final product.

The mastery of the procedures for the fabrication of the medications requires a good preparation of the environment and system presented by the 5M of efficiency: Medium, Material, Manpower, Machines, and Method.

**Key words:** Biocontamination, Aerobiocontamination, Magnesium stearate, Lactose monohydrate, Purified water, Rinsing water, Pharmacopoeia.

## المخلص

تكرس هذه الدراسة للتقييم الميكروبيولوجي والفيزيوكيميائي لناقلات التلوث (الماء النقي، ماء الشطف ، المادة الأولية والمنتوج النهائي) في صناعة المستحضرات الصيدلانية.

من أجل ضمان الجودة المطلقة للدواء، يتم إجراء الاختبارات على طول سلسلة الإنتاج، من المادة الأولية إلى المنتج النهائي. المراقبة الميكروبيولوجية والفيزيوكيميائية هي خطوة أساسية لتحرير منتج نهائي يتوافق مع المواصفات المحددة مسبقاً.

إتقان إجراءات صنع الأدوية يتطلب إعداد جيد للمحيط والنظام، التي تقدمها 5M : المكان، المادة، اليد العاملة، الأدوات، والطريقة.

### **الكلمات المفتاحية :**

التلوث البيولوجي، التلوث البيولوجي الهوائي، ستيريات المغنيسيوم، مونوهيدرات اللاكتوز، الماء النقي، ماء الشطف، دستور الصيدلة.



**Références**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### -A-

- Albert L.- Coeur A.- Lespagnol C. et Lesieur D.1974, Chimie des médicaments, Tome 1, Edition Maloine, Paris, pp : 234-324-403.
- Anonyme 1985 : LAB Aliment SANDERS, (Aliment composé vitaminisé complet),
- Anonyme 1997 : Pharmacie, Documentation juridique 2<sup>ème</sup> Edition, Alger, pp : 258.
- Anonyme 1998 : Assurance de qualité des produits pharmaceutiques, volume 1.Genève : OMS, pp : 1-2.
- Anonyme 2001 : Pharmacopée européenne, 4<sup>ème</sup> Edition, Strasbourg, Cedex France, Conseil de l'Europe, pp : 54890-57204-62584-65431.
- Anonyme 2005 : Dictionnaire des médicaments SAIDAL, Alger, pp : 209-210.

### -B-

- Bonnes pratiques de fabrication Ministère du travail. publié en mars 2014, de l'emploi et de la santé, N°2014/1bis
- BPF 2011, Bonne pratique de fabrication, LD.1. fabrication des médicaments stériles. [ed.] Bulletin Officiel.2011.vol.8 bis.

### -E-

- EMEA. 2002, Quality of Water for Pharmaceutical use.
- Ernst T, Rietschel P. Bacterial endotoxin.1994, molecular relationship of structure to activity and function. The Faseb Journal. Vol.8.

### -G-

- Gagnault (G.-A.). 1982, Principe de la recherche du médicament, Edition Masson, Paris, pp : 75.
- Gagnault (G.-A.). 1982, Principe de la recherche du médicament, Edition Masson, Paris, pp : 75.
- Gouraud A. 2012, Généralité sur la pharmacologie et les médicaments, pp : 8-42-43-48.

### -L-

- Le Hir.1997, « pharmacie galénique », Masson, Paris.
- Le Hir. 2001, Pharmacie galénique, bonne pratique de fabrication des médicaments, 7<sup>ème</sup> Edition, Masson, Paris, pp : 120-269.

### **-M-**

- M. Djim-madjim madingar. (2008), « Contrôle de qualité des médicaments : cas des antipaludéens au Burkina Faso », Université de BAMAKO, Thèse de doctorat.
- Marcel (G.- A.) et Garnier M. 1987, Le médicament de l'an 2000, Edition, Masson, Paris, pp : 5-33.
- Marcel (G.- A.) et Garnier M. 1987, Le médicament de l'an 2000, Edition, Masson, Paris, pp : 5-33.
- Ministère de l'Industrie, de la Petite et Moyenne, Rapports sectoriels. (2011), « L'industrie pharmaceutique, Etat des lieux, enjeux et tendances lourdes dans le monde et en Algérie ».

### **-P-**

- Pharmacopée Européenne 6.0. 2008, tome 1, pp 5
- Pharmacopée Européenne 6.0. 2008, tome 1, chapitre 2.6.12, Essais de dénombrement microbien, pp : 179-182.
- Pharmacopée Européenne 6.0. 2008, tome 2, pp 1905.
- Pharmacopée Européenne 6.0. 2008, tome 2, pp 2496.
- Pharmacopée Européenne 6.0. 2008, tome 2, pp 1909.
- Pharmacopée Européenne 6.0. 2008, tome 2, pp 2400.
- Pharmacopée Européenne 7.0. 2011, tome 1, chapitre 2.6.12, Essais de dénombrement microbien.

### **-R-**

- R.Denine. 2008, « Cours de pharmacie galénique », OPU, Alger.

### **-S-**

- Scriban R. 1999, Biotechnologie Tec & Doc. 5èmeEdition, Paris, pp : 927.
- Sussland (W.- A.), 1996, Le manager, la qualité et les normes ISO, Press polytechniques et universitaires romandes, pp : 185.

### **-T-**

- Talbert M.- Willoquet G. et Labayle D. 2001, Guide pharmaco, Edition Lamare, France, pp : 25-44.

### **-V-**

- Vadeville P. 1983, Gestion et contrôle de la qualité, Association Française de normalisation, Edition Masson, Paris, pp : 134.

-W-

- Willya S. 1996 le manager, la qualité et les normes ISO, Edition Masson, Paris, pp : 148.
- **Site internet :** <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/>



## **ANNEXE**

### ***Préparation des milieux de cultures***

#### **1. Gélose trypto caséine soja (TSA)**

Mettre en suspension 40g, du milieu dans un litre d'eau distillée, bien mélanger. Chauffer en agitant fréquemment et faire bouillir pendant une minute jusqu'à dissolution complète. Répartir et stériliser en autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Si on doit préparer de grands volumes. Augmenter le temps stérilisation. Mais pas la température. Si on veut préparer des boîtes de gélose ou sang pour des études d'hémolyse. Ajouter 5 à 10% de sang au milieu stérile et refroidi à environ 45°C. Mélanger doucement afin d'éviter la formation de bulles lorsqu'il est ajouté au sang milieu refroidi, tournez lentement la bouteille pour obtenir une solution homogène.

#### **2. Bouillon de MacConkey**

Mettre en suspension 35 grammes de milieu dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger et faire bouillir en agitant fréquemment pendant une minute jusqu'à dissolution complète. Pour analyser des échantillons de 10ml, préparer le milieu a double concentration répartir en tubes a essai avec de petites cloches durham en quantité de 10ml pour des échantillons de 1ml ou mans. Stériliser en l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

#### **3. Dextrose Agar Sabouraud**

Suspendre 65 g du milieu dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger. Dissoudre en chauffant fréquemment. Faire bouillir pendant une minute ou jusqu'à une solution complète. Diffusez et stérilisez en autoclave entre 118 et 121 ° C pendant 15 minutes. Éviter l'exposition excessive à la chaleur, car elle facilite l'hydrolyse des composants, ce qui ramollit le milieu.

#### **4. MacConkey Agar**

Dissoudre 55gm dans un litre d'eau distillée. Chauffer doucement pour dissoudre complètement le milieu. Stériliser en autoclave à 15psi (121 ° C) pendant 15 minutes. Refroidir à 45-50 ° C avant la distribution.

#### **5. Bouillon de soja tripticaseine (TSB)**

Mettre en suspension 30g du milieu dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger et faire dissoudre en chauffant tout en agitant fréquemment. Faire bouillir pendant

une minute jusqu'à dissolution complète. Répartir dans les récipients adaptés et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15minutes.

#### **6. L'eau peptonée**

Dissoudre 16,1 grammes de milieu dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger et dissoudre par chauffage avec agitation fréquente. Faire bouillir une minute ou jusqu'à la dissolution complète. Distribuer dans des contenants appropriés et stériliser en autoclave à 121 ° C pendant 15 minutes.

Année universitaire : 2017/2018

présenté par : HAMADOU Naima &

MOKHNACHE Asma

## **Evaluation microbiologique « Bioévaluation » & physicochimique dans l'industrie pharmaceutique**

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme master en bioindustrie  
analyse et contrôle

### **Résumé**

L'étude est consacrée à la bioévaluation dans l'industrie pharmaceutique ainsi qu'à l'évaluation physicochimique des vecteurs de contamination ex : l'eau purifiée, de l'eau de rinçage, de matière première, et du produit fini.

Afin de garantir une qualité absolue du médicament, des tests sont réalisés tout au long de la chaîne de production, de la matière première au produit fini. Le contrôle microbiologique ainsi que physicochimique constituent une étape primordiale pour la libération d'un produit fini conforme aux spécifications préétabli est indispensable lors de la fabrication des produits pharmaceutiques

La maîtrise des procédures de fabrication des médicaments doit inclure la parfaite maîtrise de l'environnement et du système en globalité présenté par les **5M** : **Milieu**, **Matière**, **Main d'œuvre**, **Matériel** et **Méthode**.

**Mots clés** : Biocontamination, Aérobiocontamination, Stéarate de magnésium, Lactose monohydrate, Eau purifiée, Eau de rinçage, Pharmacopée.

Stage : Union pharmaceutique constantinoise (UPC)

**Président de jury:** MR. KACEM CHAOUCH Nouredine

Prof. UFM Constantine 1.

**Rapporteur :** M<sup>me</sup> GHERBOUJ Ouissem

MCB. UFM Constantine1.

**Examineur:** M<sup>me</sup> HALMI Sihem

MCB. UFM Constantine1.

**Responsable du stage :** M<sup>me</sup> ABADA Meriem

Doct. en Pharmacie

Date de soutenance: 14 /09/2017