

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة فراتر منتوري
Constantine 1

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



جامعة فراتر منتوري
Constantine 1

Mémoire

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

Par : Mlle. HAMADA Nesrine
Mlle. SOUDANI Yasmine.

Thème

*Analyses microbiologiques des produits pharmaceutiques
non obligatoirement stériles à HUP PHARMA*

Jury d'évaluation:

Président de jury: Mr. KACEM CHAUCHE
Rapporteur : Mme HARZALLAH B
Examinatrice : Mme YOUCEF ALI M
Responsable de stage : Mme. OUNISSI C

Prof. Univ. Constantine 1.
Dr. Univ. Constantine 1.
Dr. Univ. Constantine 1
Responsable du laboratoire de Microbiologie
à HUP PHARMA.

ANNEE UNIVERSITAIRE: 2018-2019

Remerciements

Merci Dieu le tout puissant et miséricordieux, nous donnant la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

On voudrait tout d'abord adresser toute notre reconnaissance à notre chef de département Mr KACEM CHAOUECHE.N, Professeurs à l'Université Constantine 1, Pour ses précieux conseils et soutien durant toute la période de nos études.

On tient également à exprimer toute notre reconnaissance à notre directrice de stage, Madame OUNISSI Chiraz. On la remercie de nous avoir encadrés, orientés, aidés et conseillés. Pour sa disponibilité et la mise à disposition de tout le matériel nécessaire à la réalisation ce travail.

Tout notre gratitude va à notre encadreur, Mme HARZALLAH .B, docteur à l'université de Constantine 1, d'avoir accepté de nous encadrer et nous orienter avec une grande générosité humaine et académique.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travaille en acceptant de l'examiner et de l'enrichir par leurs propositions.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire Pour leur collaboration et serviabilité. Un merci particulier à Mlle LAHLAH Sara pour sa présence.

A madame KARA ALI Mounira, Docteur à l'Université Constantine 1, Notre guide, notre mentor ...notre deuxième maman.

Dédicaces

A mes parents qui m'ont toujours soutenue et encouragé.
Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A ma sœur Yousra, mon frère Abderrahmane
Pour leur soutien, leur aide et leur présence.

A celles qui me soutiennent, m'encouragent, me supportent, et m'inspirent ;
Menal, Ahlem, Wafa, Lina, Marwa, Batoul, Sara et Rania.

A mon meilleur ami et mon compagnon pour la vie IMeD.

J'adresse mes sincères remerciements à toute personne qui par ses paroles,
ses écrits, ses conseils et ses critiques à contribué à la réalisation de ce travail.

A toutes ces personnes je dédie ce modeste travail avec mes vifs
remerciements et les expressions respectueuses de ma profonde gratitude.

« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du Bonheur; elles
sont les charmantes jardiniers par qui nos âmes fleuries.»

-Marcel Proust

Nesrine.

Dédicaces

A mon très cher père :

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

A ma très chère mère :

. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes cotés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et mon profond estime. Puisse le tout puissant te donne santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A mes deux chers Frères :

Je ne peux exprimer à travers ces lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous deux mes chers frères. Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.

Table des matières

<u>INTRODUCTION</u>	1
Chapitre 01 : Recherche Bibliographique	1
1- PRESENTATION DE LA SOCIETE HUPP PHARMA	2
2-L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE	5
2-1-Notion sur les médicaments.....	5
2-1-1-Définition d'un médicament.....	5
2-1-2-Mise en forme d'un médicament.....	6
A-PRINCIPE ACTIF	6
B-L'EXCIPIENT	8
2-1-3-Dénomination des médicaments.....	8
2-1-4- Types de médicaments	9
3 -LES MEDICAMENTS NON-OBLIGATOIREMENT STERILES	10
3-1-Définition.....	10
3-2-les formes galéniques.....	13
3-3- Les différentes classes thérapeutiques	16
4- LES ANALYSES DU CONTROLE QUALITE	18
4-1-définition du contrôle qualité.....	18
4-2-But du contrôle qualité	18
4-3- Contrôle qualité d'un médicament	18
4-3-1- Contrôle qualité microbiologique.....	18
4-3-2- Contrôle qualité physico-chimique	19
4-3-3- Toxicité.....	19
5- ASSURANCE QUALITE	19
5-1- Les bonnes pratiques de fabrication (BPF).....	19
5-2- Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL)	20
5-3- Les cinq M	20

5-4-Autorisation de la mise sur le marché (l'AMM)	20
6- LES REFERENTIELS	21
Chapitre 02 : Matériel et méthodes	22
1-PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE	22
2-CONFIRMATION DE L'IDENTIFICATION DES SOUCHES DE REFERENCE ...	23
2-1-Mise en culture des souches de référence.....	23
2-2-Les dilutions des souches	24
2-3-Identification des souches microbiennes	25
2-3-1-Identification macroscopique	25
2-3-2-l'identification microscopique.....	25
2-3-3-Identification biochimique par galeries Api.....	28
3- LES TESTS REALISES SUR LES MILIEUX DE CULTURE	34
3-1-Test de fertilité.....	34
3-2-Test de stérilité.....	35
3-3-Validation et estimation de la croissance microbienne de l'eau peptonée	35
4-L'ANALYSE DES PRODUITS NON OBLIGATOIREMENT STERILES.....	37
4-1-Préparation de l'échantillon.....	39
4-1-1-Prélèvement.....	39
4-1-2-L'échantillonnage.....	39
4-2-Dénombrement des germes viables totaux	40
4-2-1-Préparation des dilutions	40
4-2-2-Recherche des bactéries viables totaux	40
4-3- Recherche des microorganismes spécifiques	41
4-3-1-Recherche de Staphylococcus aureus.....	41
4-3-2 -Recherche des Pseudomonas aeruginosa	41
4-3-3- Recherche de Candida albicans	41

4-3-4-Recherche des Salmonella thyphimurium.....	41
4-3-5 Recherche d'Escherichia coli	42
Chapitre 03 : Résultats et discussions	43
1-RESULTATS DE CONFIRMATION D'IDENTIFICATION DES SOUCHES DE REFERENCE	43
1-1- <i>Staphylococcus aureus</i>	43
1-2- <i>Candida albicans</i>	45
1-3- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
1-4- <i>Aspergillus niger</i>	48
1-5- <i>Salmonella typhimurium</i>	49
1-6- <i>Bacillus subtilis</i>	50
1-7- <i>Escherichia coli</i>	52
2-TEST DE FERTILITE ET STERILITE DES MILIEUX DE CULTURE	54
2-1-Test de fertilité.....	54
2-2-Test de stérilité.....	61
2-3-Validation et estimation de la croissance microbienne de l'eau peptonée	62
3-ANALYSE PRODUIT	63
3-1-L'analyse normale	64
3-2-L'analyse sans bec Bunsen	68
3-3-Analyse avec contamination.....	69
CONCLUSION.....	72
RESUME.....	73
ABSTRACT	74
ملخص.....	75
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	76

Annexes :

Annexe 01 : Les milieux de cultures

Annexe 02 : Les substrats déshydratés des différentes galeries utilisées.

Annexe 03 : Stérilisation du Matériel, des Milieux de culture et tri des déchets

Annexe 04 : Contrôle de la Bio contamination de l'environnement et de l'eau

Annexe 05 : résultats des profils numériques d'identification des souches de référence

Liste des abréviations

ADH	Arginine dihydrolase.
ADI	Acide adipique.
AMM	Autorisation de la mise sur le marché.
API	Appareillage et procédés d'identification.
ARA	Arabinose.
BPF	Les bonnes pratiques de fabrication.
BPL	Les bonnes pratiques du laboratoire.
CAP	Acide caprique.
CIT	Citrate.
DCI	Dénomination commune international.
ESC	Esculine.
EPPI	Eau pour préparation injectable.
FRU	Fructose.
FTAM	Flore total aérobie mésophile.
GAL	Galactose.
GEL	Gélatine.
GLU	Glucose.
H₂S	Sulfure d'hydrogène.
IND	Indole.
ISO	Organisation international de normalisation.
LAC	Lactose.
LDC	Lysine décarboxylase.
LNCPP	Laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutique.

MAL	Maltose.
MAN	Mannitol.
MDC	Méthyle D glucoside.
MEL	Mélioïdose.
MLT	Acide malique.
MNE	Mannose.
NAG	Acétyl glucosamine.
NE	Non entérobactéries.
NO3	Potassium nitrate.
ODC	Ornithine décarboxylase.
OMS	Organisation mondiale de la santé.
ONPG	Orthonitrophényl- β -D-galactopyrannoside.
PAL	Phosphatase Alcaline.
PNPG	P-nitrophényl- β -D-galactopyranoside.
PSM	Poste de sécurité microbiologique.
PCA	Plate acount agar.
RAF	Raffinose.
R&D des BVT	Recherche et dénombrement des bactéries viables totaux .
R&D de L&M	Recherche et dénombrement des levures et moisissures.
SAC	Saccharose.
TDA	Tryptophane désaminase.
TRE	Tréhalose.
TRP	Tryptophane.
TSA	Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja.
TSB	Milieu liquide aux peptones de caséine et de soja.

UFC/ml Unité Formant une colonie par millilitre.

URE Urée.

USP US Pharmacopeia.

UV Ultra violet.

VP Voges-Proskauer.

XLD Xylose lysine désoxycholate.

XLT Xylitol.

Liste des figures

Figure 1 : L'industrie pharmaceutique HUP PHARMA située à la zone industrielle Rhumel Constantine	2
Figure 2 : Conception du laboratoire Microbiologique de HUP PHARMA.....	4
Figure 3 : Standard des McFarland	28
Figure 4 : Fiche de résultats de la galerie API	31
Figure 5 : Aspect macroscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu TSA après 24h d'incubation.....	43
Figure 6 : Aspect de <i>Staphylococcus aureus</i> sous microscope optique	54
Figure 7 : Api Staph après incubation avec sa fiche de lecture.....	44
Figure 8 : Aspect macroscopique de <i>Candida albicans</i> sur milieu Saboraud après 24h d'incubation.....	45
Figure 9 : Api Candida après incubation.....	45
Figure 10 : Aspect macroscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur milieu TSA après 24h d'incubation.....	46
Figure 11 : Aspect de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sous microscope optique	46
Figure 12 : Api 20 NE après incubation.....	47
Figure 13 : Aspect macroscopique de l' <i>Aspergillus niger</i> sur milieu Saboraud après 7jrs d'incubation.....	48
Figure 14 : Aspect de l' <i>Aspergillus niger</i> sous microscope optique après coloration au bleu de lactophénol (Grossissement $\times 10$).	48
Figure 15 : Aspect macroscopique de <i>Salmonella typhimurium</i> sur milieu TSA après 24h d'incubation.....	49
Figure 16 : Aspect de <i>Salmonella typhimurium</i> sous microscope optique (Grossissement $\times 100$).	49
Figure 17 : Api 20E après incubation.....	50
Figure 18 : Aspect macroscopique du <i>Bacillus subtilis</i> sur milieu TSA après 24h d'incubation.....	50
Figure 19 : Aspect de <i>Bacillus subtilis</i> sous microscope optique (Grossissement $\times 100$).	51
Figure 20 : Api 50 CH après incubation de 24 et 48 heures.	51
Figure 21 : Aspect macroscopique d' <i>Escherichia coli</i> sur milieu TSA après 24h d'incubation.....	52
Figure 22 : Aspect d' <i>Escherichia coli</i> sous microscope optique (Grossissement $\times 100$).	52
Figure 23 : Api 20E après incubation.....	53
Figure 24 : Fertilité du milieu Macconkey Broth après 24 heures d'incubation.....	54
Figure 25 : Inhibition du milieu Macconkey Broth après 24 heures d'incubation.....	54
Figure 26 : Fertilité du milieu Macconkey Agar après 24 heures d'incubation.....	55
Figure 27 : Fertilité du milieu Rappaport Soy Broth après 24 heures d'incubation.	55
Figure 28 : Inhibition du milieu Rappaport Soy Broth après 24 heures d'incubation.	56
Figure 29 : Fertilité du milieu XLD Agar après 24 heures d'incubation.	57
Figure 30 : Fertilité du milieu Sabouraud après 24 heures d'incubation.	57
Figure 31 : Fertilité du milieu Cétrimide après 24 heures d'incubation.	58

Figure 32 : Fluorescence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sous UV.	58
Figure 33 : Inhibition d' <i>Escherichia coli</i> par le milieu Cétrimide après 24 heures d'incubation.....	59
Figure 34 : Fertilité du milieu Mannitol après 24 heures d'incubation.....	59
Figure 35 : Inhibition du milieu Mannitol après 24 heures d'incubation.....	60
Figure 36 : Fertilité du milieu TSB après 24 heures d'incubation.	60
Figure 37 : Fertilité du milieu TSA après 48 heures d'incubation.....	61
Figure 38 : Résultats de stérilité des milieux liquides.....	61
Figure 39 : Résultats de stérilité des milieux liquides.....	62
Figure 40 : Tubes d'eau péptonée après 24h d'incubation	68
Figure 41 : Aspect macroscopique des colonies autres qu' <i>E.coli</i> sur milieu Macconkey agar des lots 13, 17 et 22.....	65
Figure 42 : Aspect microscopique après coloration de Gram des colonies autres qu' <i>E.coli</i> sur milieu Macconkey agar des lots 13, 17 et 22 au grossissement x100.....	65
Figure 43 : Identification biochimique des souches autres qu' <i>E. coli</i> sur milieu Macconkey agar des lots 13, 17 et 22.	66
Figure 44 : Observation macroscopique de la souche du lot 22 sur milieu Sabouraud (face et revers).....	67
Figure 45 : Observation sous microscope optique de la souche du lot 22 (photo de référence <i>Penicillium subrubescens</i> by Jos Houbraken, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, The Netherlands).	77

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères d'acceptation de la qualité microbiologique des produits pharmaceutiques non stériles.....	10
Tableau 2 : Liste de micro-organismes spécifiés pour lesquels sont établis des critères d'acceptation.	11
Tableau 3 : Les souches microbiennes de références utilisées et leurs dilutions validées	24
Tableau 4 : Lecture des réactions de la galerie après les tests complémentaire.	29
Tableau 5 : Les différents types des galeries API utilisées.....	32
Tableau 6 : Les milieux de culture testés.....	36
Tableau 7 : Planning des différentes analyses réalisées.....	38
Tableau 8 : Le prélèvement des différentes formes galéniques utilisées.....	39
Tableau 9 : Mesure de l'absorbance de l'eau peptonée à une longueur d'onde de 600 nm	62
Tableau 10 : Résultats de l'analyse bormale.....	64
Tableau 11 : Résultats d'observation macro et microscopique du Lot 22.....	64
Tableau12 : Résultats d'analyse sans bec bunsen.....	68
Tableau 13 : Résultats d'analyse avec contamination.....	69
Tableau 14 : résultats de l'analyse complète d'un lot (Lot 6).....	70

Introduction

La qualité des médicaments est un des majeurs soucis des professionnels de la santé et des patients, elle se définit par la maîtrise d'ensemble de paramètres et de propriétés permettant d'assurer leur sécurité, et amener le médicament à un niveau d'exigences satisfaisant. Afin d'y parvenir, il faut évaluer les risques microbiologiques liés à la présence de pathogènes dans les médicaments, ce qui constitue un grand risque pour les patients et un défi pour les responsables de la sécurité sanitaire. Par ce fait, la maîtrise de la biocontamination dans l'industrie pharmaceutique reste une préoccupation constante et s'inscrit dans le contexte général de l'efficacité et de la sécurité des médicaments. Cette qualité est garantie par une série de contrôles qui sont maintenant présents tout au long de la chaîne de production (Matières premières, Milieu, Main d'œuvre, matériels, process) et même au niveau du produit fini pour répondre aux exigences réglementaires. **(Benattia ; 2012)**

Le présent travail a été réalisé dans le cadre du contrôle de la qualité microbiologique de différentes formes pharmaceutiques des médicaments non-obligatoirement stériles fabriqués par l'industrie HUPP PHARMA dans le but d'identifier tout agent nuisible et d'assurer leur qualité microbiologique.

Pour ce faire nous avons structuré notre travail en trois grandes parties ;

La première est réservée à la synthèse bibliographique ; Elle comportera une description de l'industrie pharmaceutique, des généralités sur les médicaments et des spécificités sur les non obligatoirement stériles ; sous leurs différentes formes galéniques et effets thérapeutiques, le contrôle qualité d'un médicament et enfin une présentation de la société HUPP PHARMA.

La seconde partie quant à elle s'intéresse à l'étude expérimentale. Elle comporte les différentes procédures effectuées afin de réactiver et identifier les souches de références fournies par le laboratoire ainsi que la préparation des milieux de cultures fertiles et stériles pour la réalisation de l'analyse microbiologique de certains produits non obligatoirement stériles et leurs composants.

La troisième partie de ce manuscrit expose les résultats obtenus ainsi que leur discussion et il s'achève par une conclusion et d'éventuelles perspectives.

Chapitre 01 :

*Recherche
Bibliographique*

1- Présentation de la société HUPP PHARMA

C'est une société Algérienne spécialisée dans la production et le développement des médicaments génériques, Créée en Octobre 2011 par Mr. Belhadj Mostefa Toufik disposant également de 3 entreprises couvrant les différentes branches de l'industrie Pharmaceutique telle que l'élaboration de médicaments à usage humain, vétérinaire et la distribution.

En termes d'infrastructure (Figure 1), elle se compose de 3 bâtisses séparées qui abritent 05 unités de production indépendantes (cinq autres unités sont en cours de réalisation), s'étalant sur une superficie de presque 10.000 m² logées à la zone industrielle Palma de Constantine, elle dispose également des équipements technologiques de haute performance pour sa production et d'un laboratoire de contrôle qualité physico-chimique et microbiologique.




Figure 1:L'industrie pharmaceutique HUPP PHARMA située à la zone industrielle Rhumel Constantine .

Classée parmi les leaders des industriels pharmaceutiques et premier fabricant des suspensions injectables, des céphalosporines et des collyres ophtalmiques en Algérie. **HUPP**

PHARMA a pour objectif de se développer à l'international. Pour cela, elle s'est engagée dans une mise à niveau par l'application d'un système de management de qualité (ISO).

L'objectif de la société est de se développer, fabriquer et commercialiser des médicaments dotés d'une efficacité thérapeutique très haute, la gamme pharmaceutique HUP Pharma comprend pour le moment dix familles de produits dont les techniques de contrôle ont été validées par le Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (LNCPP), on cite :

- Les cardiovasculaires ;
- Infectiologie (antibiotique, antiviraux, antiparasitaire et antimycosique) ;
- Les gastroentérologique ;
- Les anti-inflammatoire (stéroïdiens et non stéroïdiens) ;
- Les antidiabétiques oraux ;
- Les antianémique et vitamines ;
- Neurologique ;
- Rhumatologique ;
- Urologique ;
- Antiallergique ;
-

 Tout au long de ce travail, nous vous expliqueront les différentes analyses effectuées sur des produits pharmaceutiques non obligatoirement stériles réalisées au niveau du laboratoire de contrôle de la qualité microbiologique (figure 2)

Le laboratoire d'analyses microbiologiques (figure 2) est composé de vestiaires, d'une salle de rédaction, d'une laverie, d'une salle de préparation et de stérilisation du matériel et des milieux de culture, d'une salle d'échantillonnage et d'une salle de manipulation où toutes les analyses ont été réalisées. S'ajoute à cela une salle de contrôle des médicaments obligatoirement stériles.

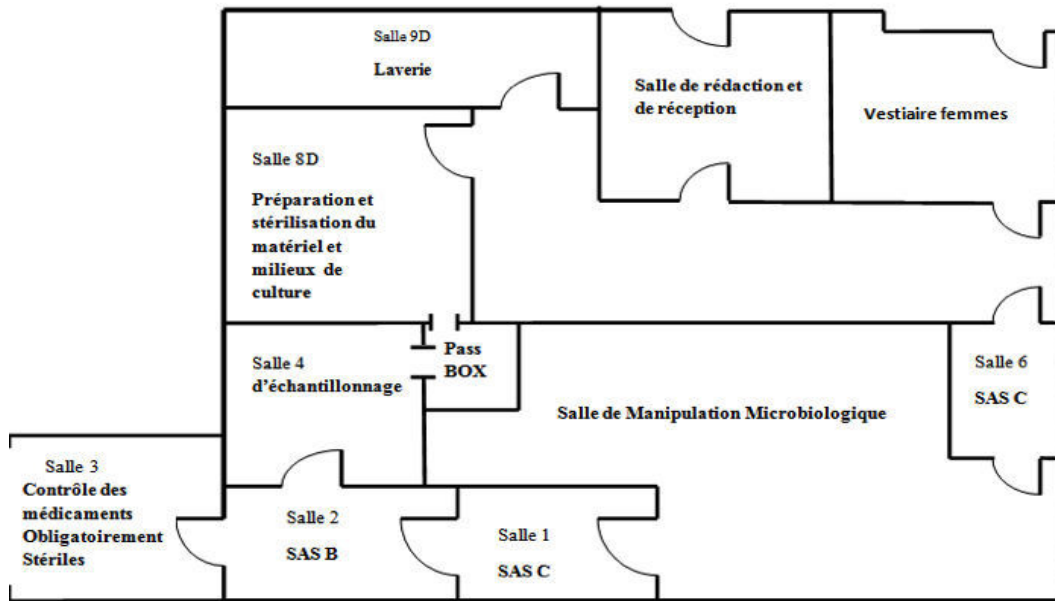


Figure 2 : Conception du laboratoire Microbiologique de HUPP PHARMA

2-l'industrie pharmaceutique

Le marché pharmaceutique consiste à lui seul un enjeu majeur. En 2003, la consommation mondiale à pratiquement atteint 500 milliers de dollars U.S, en progression de 9% par rapport à l'année précédente. Le développement s'inscrit dans une évolution logique de l'accès d'un plus grand nombre de population aux soins médicaux, alors que la croissance de l'économie et plus particulièrement celle des pays en voie de développement ne suit pas la même courbe de croissance. Cette contradiction tend à être corrigée par les politiques nationales de santé volontaire, qui favorisent de plus en plus l'utilisation des médicaments génériques.

L'industrie pharmaceutique Algérienne est confrontée 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 coût, tout en respectant les critères d'efficacité, de qualité, de sécurité et de tolérance(**Le Hir, 2001 ; Baronas, 2006**).

2-1-Notion sur les médicaments

2-1-1-Définition d'un médicament

Le médicament est un mot d'origine latin (medicamentum) dont la première apparition date de 1314 « Il le définit comme une substance employée pour traiter une affection ou bien une manifestation morbide » (**Helali, 1989**).

Selon le code de la santé publique, sur la base de l'article L511 : on entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme, en vue d'établir un diagnostic médical, de restaurer, de corriger ou de modifier des fonctions physico-logiques » (**Moulin et Coquerel, 1998 ; Gouraud, 2002**).

2-1-2-Mise en forme d'un médicament

La formulation d'un médicament est constituée d'un ou plusieurs principes actifs d'origine diverses, d'excipients et d'additifs nécessaires à la fabrication et la conservation du produit fini.

A-Principe actif

Tout composant d'un médicament est destiné à exercer une action pharmacologique ou un autre effet direct en rapport avec le diagnostic, le traitement ou la prévention d'une maladie, ou à agir sur la structure ou les fonctions de l'organisme humain ou animal par des moyens pharmacologiques (Ajache *et al.*, 2000).

➤ **Les différentes origines de principe actif**

Origine biologique

Ce sont des substances extraites des êtres vivants, par exemple des animaux, végétaux, microorganismes (Allo *et al.*, 2003).

Origine végétale

L'utilisation des plantes en thérapie s'appelle la phytothérapie. Bien que cette science soit assimilée à une thérapeutique ancienne, traditionnelle et sans danger, c'est une technique d'avenir. Déjà, à l'heure actuelle 60% des médicaments sont entièrement d'origine végétale, et 20 % le sont en partie (Allo *et al.*, 2003).

Origine animale

L'utilisation d'organe, glandes, tissus de vivant en thérapeutique s'appelle l'opothérapie. Par exemple, l'huile de foie de morue ou des hormones telle que la FSH ou la LH utilisées comme inducteurs d'ovulation qui provient de l'urine de femme enceinte (Allo *et al.*, 2003)

Origine microbiologique

Les principes actifs sont extraits de microorganismes par exemple, les vaccins sont obtenus à partir de bactéries ou virus atténués ou tués. Certains microorganismes cultivés sécrètent des substances utilisées en thérapeutique : les antibiotiques par exemple, la pénicilline vient d'un champignon : le penicillium (Allo *et al.*, 2003).

Origine minérale

L'utilisation des minéraux en thérapeutique est très ancienne, avant même l'existence de la chimie moderne. On distingue :

- Les produits naturels purifiés : par exemple, le soufre, l'eau, l'argile...
- Les produits obtenus par les réactions de chimie minérale : par exemple, le bicarbonate de sodium... (Allo *et al.*, 2003).

Origine synthétique

Ces médicaments sont obtenus :

- Par biosynthèse : le principe actif est reproduit par synthèse, soit pour des raisons d'économie car il est parfois moins cher de le fabriquer que de l'extraire, soit par sécurité.
- Par héli synthèse : dans ce cas, les substances naturelles existantes sont modifiées chimiquement pour augmenter leur activité et diminuer leurs effets secondaires.
- Par synthèse totale : ces principes actifs, créés de manière entièrement synthétique, n'existe pas à l'état normal par exemple les sulfamides (Allo *et al.*, 2003).

Origine biotechnologique

C'est une technique très élaborée basée sur le génie génétique, le but est d'isoler des cellules vivantes et leur faire produire des substances d'intérêt thérapeutique. Les

ordres sont donnés à la cellule productrice sous forme d'ADN recombiné et injecté, par exemple l'interféron, les hormones de croissance (**Allo et al., 2003**).

B-L'excipient

Est une substance ou un mélange de substances d'origine chimique ou naturelle dites auxiliaires, qui facilitent la préparation et l'emploi du médicament mais ne présentent pas d'effet ou activité thérapeutique, il est ajouté au principe actif pour lui donner un goût ou une forme (**Landry, 2012**)

C- Additif

Divers additifs entrent dans la composition des médicaments pour différentes raisons, on en trouve des conservateurs, antimicrobiens et des antioxydants, ils sont utilisés pour améliorer la conservation donc, augmenter la durée de vie des médicaments ; soit en retardant l'oxydation des principes actifs et des excipients ou en réduisant la prolifération microbienne (**Alais et Linden, 1997**).

2-1-3-Dénomination des médicaments

Tout médicament est caractérisé par la désignation chimique de son principe actif, la Dénomination Chimique Internationale (D.C.I) est un ou divers noms de marque aussi appelés noms de fantaisie (**Dessaigne, 2004**).

Le nom chimique est l'interprétation exacte de la molécule chimique du médicament. Il n'est pas employé en pratique habituelle. La DCI est le nom abrégé de la molécule chimique. Elle est assignée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (**Aveline et al., 2000**). Le nom de « spécialité » ou « nom de marque » est conféré à une

molécule par le laboratoire qui le commercialise. Une semblable molécule active est fréquemment vendue par un grand nombre de laboratoires sous de nombreux noms de spécialités distinctes.

2-1-4- Types de médicaments

Selon la pharmacopée, sur le plan microbiologique les produits pharmaceutiques peuvent être divisés en deux produits :

➤ **Les produits qui doivent être obligatoirement stériles**

Les produits obligatoirement stériles sont des produits " exempte de micro-organismes". Le contrôle de qualité microbiologique de ces produits consiste à vérifier sa stérilité, ainsi que la recherche de pyrogènes et d'endotoxines. (**Pharmacopée Européenne.2014, 8^{ème} Edition**).

-Les produits qui doivent être stérile sont les suivant :

- Les préparations pour usage parentéral (introduction d'une substance dans l'organisme par une autre voie que la voie digestive, exemple : injection sous-cutanée, intraveineuse ou intramusculaire)
- Les préparations ophtalmiques
- Les pansements chirurgicaux et le matériel chirurgical
- Autre préparations devant être stériles

➤ **Les produits non obligatoirement stériles**

Selon la pharmacopée les préparations pharmaceutiques non stériles obligatoirement sont :

- Les matières premières.
- Les médicaments à usage non parentéral.

3 -Les médicaments non-obligatoirement stériles

3-1-Définition

Tout médicament qui doit répondre aux critères de pureté microbiologiques appropriés qui figurent dans les monographies de la pharmacopée, cela implique la création d'un médicament dans un environnement propre mais n'exige pas que l'environnement soit complètement exempt de tous les microorganismes, dans le but de garantir l'efficacité thérapeutique et la sécurité de ce dernier pour le patient.(Ratajczak *et al.*, 2014).

La qualité microbiologique des produits à usage pharmaceutique non-stérile

Les critères d'acceptation applicables aux produits pharmaceutiques non stériles sur la base :

-Du dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) et du dénombrement des moisissures/levures totales (DMLT) (voir tableau 1) Ces critères d'acceptation reposent sur des résultats individuels, ou sur des résultats moyens lorsque l'on effectue plusieurs dénombrements. (Pharmacopée Européenne, 2014)

Tableau 1: Critères d'acceptation de la qualité microbiologique des produits pharmaceutiques non stériles.

	DGAT (UFC/g ou UFC/ml)	DMLT (UFC/g ou UFC/ml)
Substances pour usage pharmaceutique	10 ³	10 ²

-Lorsqu'un critère d'acceptation est prescrit en matière de qualité microbiologique, il est interprété comme suit :

- 10¹ UFC : nombre maximum acceptable = 20 ;
- 10² UFC : nombre maximum acceptable = 200 ;
- 10³ UFC : nombre maximum acceptable = 2000 ; et ainsi de suite.

-Le tableau 2 comprend une liste de micro-organismes spécifiés pour lesquels sont établis des critères d'acceptation :

-La présence des micro-organismes doit être évaluée au regard de différents facteurs

- ✓ **Utilisation du produit :** Risque variable selon la voie d'administration (Ophtalmique, nasale, respiratoire) ;
- ✓ **Nature du produit :** Aptitude à favoriser la croissance microbienne, propriétés antimicrobiennes adéquates ;
- ✓ **Mode d'administration ;**
- ✓ **Catégorie visée du patient:** Risque potentiellement différent pour les nourrissons, les jeunes enfants, les personnes fragiles ;
- ✓ **Emploi d'agents immunosuppresseurs, de corticostéroïdes ;**
- ✓ **Existence de pathologies, de blessures, de lésions organiques ;(Pharmacopée Européenne, 2014)**

Tableau 2 : Liste de micro-organismes spécifiés pour lesquels sont établis des critères d'acceptation.

Voies d'administration	DGAT UFC/g ou UFC/ml	DMLT UFC/g ou UFC/ml	Microorganismes spécifiés
Voie orale : Préparations non aqueuses	10 ³	10 ²	Absence d' <i>E.coli</i> (1g ou 1 ml)
Voieorale : preparations aqueuses	10 ²	10 ¹	Absence d' <i>E.coli</i> (1g ou 1 ml)
Voierectale	10 ³	10 ²	
Voie buccale	10 ²	10 ¹	Absence de <i>S.aureus</i> (1 g ou 1ml)
Voie gingivale			Absence de <i>P. aeruginosa</i> (1 g ou 1ml)
Voie cutanée			
Voie nasale			
Voieauriculaire			

Revue Bibliographique

Voie vaginale	10^2	10^1	<p>Absence de <i>P.aeruginosa</i>(1 g ou 1ml)</p> <p>Absence de <i>S.aureus</i>(1 g ou 1ml)</p> <p>Absence de <i>C.albicans</i> (1 g ou 1ml)</p>
Voie transdermique (limites pour un dispositif transdermique, film protecteur et support compris)	10^2	10^1	<p>Absence de <i>S.aureus</i> (1 g ou 1ml)</p> <p>Absence de <i>P.aeruginosa</i>(1 g ou 1ml)</p>
Inhalation (des exigences spécifiques s'appliquent aux préparations liquides dispensées au moyen de nébuliseurs)	10^2	10^1	<p>Absence de <i>S.aureus</i>(1 g ou 1ml)</p> <p>Absence de <i>P. aeruginosa</i>(1 g ou 1ml)</p> <p>Absence de bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires</p>
Disposition spéciale de la Ph.Eur..Pour les préparations pour administration par voie orale contenant des matières premières d'origine naturelle, lorsqu'un prétraitement antimicrobien et imposable et que l'autorité compétente admet une DGAT des matières premières supérieures à 10^3 UFC/g ou UFC/ml	10^4	10^2	<p>Au minimum 10^2 UFC de bactéries gram-négative résistantes aux sels biliaires (1 g ou 1 ml)</p> <p>Absence de <i>Salmonelles</i> (1g ou 1 ml)</p> <p>Absence d'<i>E.coli</i> (1g ou 1 ml)</p> <p>Absence de <i>S.aureus</i> (1 g ou 1ml)</p>

3-2-les formes galéniques

✚ Les formes destinées à la voie rectale

Elles permettent une action locale ou systémique du principe actif.

a- Les suppositoires :

Ce sont des préparations solides qu'il faut garder dans le réfrigérateur, contenant une unité de pris du principe actif. Leurs formes, volumes et consistances sont adaptées à l'administration par voie rectale. (**Champe *et al.*, 2000, Pharmacology**).

b- Suspensions et solutions à usage rectal

Ce sont des préparations liquides contenant une unité de prise de médicament. Le principe actif est dissout ou dispersé dans un excipient comme l'eau ou la glycérine.

Leur volume varie de 2.5 à 2000 ml. Le récipient est de forme adaptée à l'administration dans le rectum. (**Champe *et al.*, 2000, Pharmacology**).

✚ Les formes destinées à la voie orale

A.Les formes galéniques solides

Dans les produits secs le principal avantage est la meilleure conservation du principe actif ; Les formes solides constituent 55 % des médicaments. (**Champe *et al.*, 2000, Pharmacology**)

1) Poudre orale

Ce sont des préparations constitués de particules solides, libres, sèches et +/- fines. Elles peuvent être effervescentes. Elles sont absorbées parfois à la cuillère et parfois après suspension dans l'eau. (**Champe et al., 2000, Pharmacology**)

2) Formes obtenues par répartition des poudres dans des enveloppes

Une sécurité d'emploi est assurée puisque l'on connaît exactement la quantité du principe actif administré à chaque fois que le patient absorbe une unité de prise. (**Champe et al., 2000, Pharmacology**)

a- Les sachets

Petit sac dont les bords sont soudés ou collés qui renferme une unité de prise médicamenteuse, la poudre sert à la préparation de solution, en suspension, orale. Cette forme est très utilisée en pédiatrie. (**Champe et al., 2000, Pharmacology**)

b- Gélule ou capsule dure

Constituée d'une enveloppe de forme cylindrique à base hémisphérique renfermant une unité de prise du médicament. L'enveloppe est constituée de deux capsules à emboîtement dont la paroi à base de gélatine est dure et mince, le contenu peut être pulvérulent ou granuleux. (**Champe et al., 2000, Pharmacology**)

3) Formes obtenues par traitement des poudres

a-Comprimés

La forme pharmaceutique la plus répandue. C'est une préparation de consistance solide obtenue en agglomérant par compression des particules de poudres renfermant une unité de prise de médicament avalé, croqué ou dissout dans l'eau. (**Champe et al., 2000, Pharmacology**)

✓ Avantages

- Solidité suffisante pour résister aux manipulations ;

- Conservation facile ;
- Possibilité de fabriquer de nombreuses variétés ;
- Comprimé non enrobé ;
- Comprimé effervescent ;
- Comprimé soluble ou dispensable ;
- Comprimé enrobé ;
- Comprimé gastrorésistant ;
- Comprimé à libération modifiée ;
- Comprimé à utiliser dans la cavité buccale.

b-Granulés

Ce sont des préparations constituées par des grains solides et secs formés par agrégation de particules de poudre. Avalés tels quels, croqués, dissouts désagrégés dans l'eau ou effervescent. Présentés soit dans une boîte multi doses où l'on prélève à la cuillère soit en dose unitaire. (**Champe *et al.*, 2000, Pharmacology**)

4) Capsules molles

Constituées d'une enveloppe épaisse, d'un seul bloc et de formes variables renfermant une unité de prise de médicament.

-Enveloppe = gélatine élastique, contenu pâteux ou liquide, conservé à l'abri de la chaleur. (**Champe *et al.*, 2000, Pharmacology**)

B- Les formes galéniques liquides

Leur avantage est que c'est une forme d'action rapide, car elle ne nécessite pas de dissolution dans le tube digestif (environ 12 % des médicaments). (**Champe *et al.*, 2000 Pharmacology**)

1) Forme multi doses

a-Sirops

Préparation aqueuse de saveur sucrée et de consistance visqueuse. Un sirop renferme 550 g de sucre / L. La forte teneur en sucre assure une protection antimicrobienne. Se conserve dans une bouteille bien close. (**Champeet al.,2000, Pharmacology**)

b-Liquide pour admission orale

Solution, émulsion ou suspension contenant un ou plusieurs principes actifs dans un solvant approprié : eau, alcool et huiles. Administration à la cuillère ou par gouttes diluées dans de l'eau. (**Champe et al., 2000, Pharmacology**)

2) Forme unitaires

a-Ampoules buvables

Répartition d'un soluté buvable dans des ampoules (en verre jaune ; ampoule injectable : verre incolore). (**Champe et al., 2000, Pharmacology**)

3-3- Les différentes classes thérapeutiques

- **Les Antiasthéniques**

Les "antiasthéniques" sont le plus souvent des mélanges d'acides aminés, de vitamines et de sels minéraux, mais également des cocktails de stimulants variés indispensables au métabolisme. Pour lutter contre la fatigue. (**Resplandy, 2015**).

- **Les Anti-inflammatoire**

Ce sont des médicaments qui peuvent réduire la douleur, l'inflammation, et dans certains cas, la fièvre. Une inflammation est une rougeur, une sensation de chaleur, une

enflure et un afflux de sang accru qui se produisent en raison d'une infection, d'une maladie ou d'une blessure. Il existe deux principaux types d'anti-inflammatoires : Les stéroïdiens AIS et les non stéroïdiens AINS (**Garnier *et al.*, 1995**).

- **Les Antispasmodiques**

Ce sont des médicaments destinés à traiter les spasmes, ces spasmes étant principalement digestifs ou génito-urinaires. Les spasmes sont des contractions intenses, brutales de la musculature dite involontaire ou lisse (les muscles que l'on ne contrôle pas par la volonté). Ce type de musculature permet, par exemple, la progression du bol alimentaire dans nos intestins. (**Resplandy, 2015**).

- **Les Hypolipémiants**

Ces médicaments sont destinés à normaliser les taux des lipides sanguins. Les lipides concernés sont le cholestérol et les triglycérides. Lorsque leurs taux sanguins sont augmentés, le risque de maladie cardiovasculaire (infarctus, thrombose, etc.) est considérablement augmenté. (**Resplandy, 2015**).

- **Les Antidiabétiques Oraux**

Les antidiabétiques oraux (ADO) sont introduits en thérapie après trois mois d'échec d'un régime diététique. Un des critères de choix des antidiabétiques oraux est la surcharge pondérale. On distingue les antidiabétiques qui ont une action sur :

- L'insulinorésistance : biguanides, thiazolidinediones, principalement indiqués chez les patients diabétiques obèses.

- L'insulinosecrétion : sulfamides, glinides, indiqués en première intention chez les patients présentant une obésité peu sévère.

- Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase indiqués chez les patients présentant des glycémies à la limite supérieure. (**Domenzi, 2011**)

4- Les Analyses du contrôle qualité

4-1-définition du contrôle 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**)

Le contrôle analytique des médicaments ou certain de leurs constituants, est indispensable pour garantir l'efficacité et l'innocuité du médicament pendant sa durée de validité proposée durant la phase de stockage, de distribution et d'utilisation. Le contrôle doit, autant que possible être effectué selon des spécifications élaborées et validées lors de la fabrication de produit (**O.M.S, 1998**).

4-2-But du contrôle qualité

Le contrôle de qualité consiste à déceler les erreurs dépassants les limites jugées raisonnables, de manière à en corriger les causes ou à les prévenir. En général dans toutlaboratoire de biologie, le contrôleest de vérifier le fonctionnement des appareils, la manipulation, ainsi que la précision et l'exactitude d'une technique (**Vadville, 1983**).

Le contrôle effectué sur 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. Les contrôles de la conformité ont pour finalité de confirmer que le produit fabriqué répond aux normes homologuées et/ou aux spécifications légales et réglementaires qui le concernent (**Documentation juridique, 1997**).

4-3- Contrôle qualité d'un médicament

4-3-1- Contrôle qualité microbiologique

Les contrôles microbiologiques doivent permettre de garantir une bonne qualité hygiénique et marchande du produit fabriqué. De plus, ils doivent permettre de minimiser les pertes dues aux mauvaises conditions de fabrication et donc d'avoir le moins possible de produits non conformes et de garantir un bon rendement (**Scriban. 1999**).

4-3-2- Contrôle qualité physico-chimique

Le contrôle physico-chimique sert à vérifier la structure de la molécule et d'établir les propriétés physiques et chimiques (Taux de friabilité, acidité/alcalinité, dissolution, Dessiccation). Il permet ainsi de vérifier et de s'assurer du bon usage de la substance annoncée (analyses qualitatives, réactions d'identification les plus sélectives possibles) (**Albert et al.1974**).

4-3-3- Toxicité

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**).

Les études toxicologiques permettent d'éliminer de très nombreuses molécules dont les risques outrepassent les avantages (**Marcel et Garnier, 1987**).

5- Assurance qualité

Elle représente l'ensemble des mesures prises pour s'assurer que les préparations sont de la qualité voulue pour l'usage auquel elles sont destinées. Elle est acquise par la mise en œuvre d'un ensemble adapté à des activités préétablies et systématiques, destinées à donner confiance en l'obtention de la qualité requise. (**Fonteneau et Klusiewicz, 2008**).

Le but de l'assurance de qualité des produits pharmaceutiques est à la fois de garantir immédiatement la qualité des médicaments et de garantir la qualité de toutes les activités et prestations pharmaceutiques professionnelles qui influent sur la qualité des médicaments. (**Alexandre, 2014**).

5-1- Les bonnes pratiques de fabrication (BPF)

L'OMS définit les Bonnes Pratiques de Fabrication comme « un des éléments de l'assurance de la qualité, garantissant que les produits sont fabriqués et contrôlés de façon uniforme et selon des normes de qualité adaptées à leur utilisation et spécifiées dans l'autorisation de mise sur le marché».

L'objectif primaire des BPF est la parfaite maîtrise de la fabrication des médicaments. Elles sont destinées à servir de références lors de l'examen des demandes d'autorisation de fabrication et lors d'inspection des fabricants de médicaments. Elles précisent un ensemble de recommandations pour éviter tout oubli, et toute contamination. (**Lambert et Roxane, 2013**)

5-2- Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL)

« Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) forment un système de garantie de qualité portant sur le mode d'organisation des études de sécurité non cliniques ayant trait à la santé et à l'environnement et sur les conditions dans lesquelles ces études sont planifiées, réalisées, contrôlées, enregistrées, archivées et diffusées»(**Economique, OECD Organisation de Coopération et de Développement ; 1998**)

5-3- Les cinq M

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

- **Matière** (matières premières, fournitures, pièces, qualité, etc.),
- **Milieu** (environnement, contexte, marché, concurrence, législation, etc.),
- **Méthodes** (mode opératoire, recherche et développement, instructions, etc.),
- **Matériel** (équipements, machines, outils, logiciels, etc.),
- **Main d'œuvre** (ressources humaines, compétences, formation, etc.)

5-4-Autorisation de la mise sur le marché (l'AMM)

Document officiel émis par l'autorité compétente de réglementation pharmaceutique, destiné à autoriser la commercialisation ou la distribution d'un produit après évaluation de son innocuité, de son efficacité et de sa qualité. Sur ce document doivent figurer entre autres :

le nom du produit, la forme galénique, la formule (avec les excipients) donnant les quantités par dose unitaire (en se servant des dénominations communes internationales ou des noms génériques dans le pays lorsqu'ils existent), la durée de vie, les conditions de stockage et les caractéristiques du conditionnement. Cette autorisation comporte également des informations agréées destinées aux professionnels de la santé et au public, la catégorie de vente, le nom et l'adresse du détenteur de l'autorisation et la durée de validité de celle-ci. (**Organisation mondiale de la santé, 2000**).

6- Les référentiels

La pharmacopée est un ouvrage réglementaire destiné à être utilisé par les professionnels de santé. Elle définit notamment les critères de pureté des matières premières ou des préparations entrant dans la fabrication des médicaments (à usage humain ou vétérinaire) et les méthodes d'analyse à utiliser pour en assurer leur contrôle. Elle définit aussi les formes pharmaceutiques (ou galéniques) avec leurs critères de qualité et les essais à réaliser pour vérifier ces critères de qualité. (**Pharmacopée européenne, 2004**)

L'ensemble des critères, permettant d'assurer une qualité optimale des matières premières pharmaceutiques ou des formes pharmaceutiques, est regroupé et publié sous forme de monographies spécifiques ou générales. (**Wehrlé, 2007**)

Le rôle de la pharmacopée est de participer à la protection de la santé publique en élaborant des spécifications communes et reconnues pour les matières premières pharmaceutiques et les formes pharmaceutiques. Ces normes font autorité pour toute substance ou forme galénique figurant dans la pharmacopée qui constitue un référentiel scientifique régulièrement mis à jour. (**Pharmacopée américaine, 2007**).

La référentielle du contrôle qualité utilisée par le laboratoire de HUPP PHARMA est la pharmacopée européenne 9ème et dernière édition.

Chapitre 02 :

Matériel et méthodes

1-Préparation des milieux de culture

On a procédé à la préparation de 10 milieux (voir annexe 1), pour cela :

→ Pour le dénombrement de la flore mésophile totale et des levures et moisissures, on a préparé les milieux suivants :

- **TSA** (de la marque PRONADISA) ;
- **Sabouraud** (de la marque PRONADISA).

→ Pour la sélection des microorganismes spécifiques, on a préparé les milieux suivants :

- **Cetrimide agar** (de la marque LIOFILCHEM) ;
- **Mannitol salt agar** (de la marque TMMEDIA) ;
- **XLD agar** (de la marque LIOFILCHEM) ;
- **Macconkey agar** (de la marque PRONADISA) ;
- **Macconkey broth** (de la marque PRONADISA) ;
- **Rappaport soy broth** (de la marque PRONADISA) ;
- **TSB** (de la marque PRONADISA) .

✓ **Méthodologie :**

Sur la balance électrique on pèse chaque milieu sous sa forme déshydratée, l'eau peptonée est ajoutée jusqu'au volume souhaité, puis la dissolution du milieu est assurée en plaçant le bêcher sur la plaque et en ajoutant les barreaux magnétiques, le pH est ajustée si nécessaire avant chauffage et cuisson.

Après cuisson du milieu, on le répartit dans :

→ des flacons de 100 ml pour les milieux liquides ;

→ des flacons de 500 ml pour les milieux gélosés et les solutions.

- Les flacons sont étiquetés et prêts à être stériliser (le milieu XLD est non stérilisable).

Remarque : Après la préparation et avant l'autoclavage de chaque milieu le pH doit être mesuré après dissolution complète du milieu, ce dernier doit être de la valeur mentionnée

sur l'emballage de chaque milieu dans le cas contraire, on ajoute le HCL pour diminuer le pH ou le NAOH pour l'augmenter.

2-Confirmation de l'identification des souches de référence

Les souches de références mentionnées dans le tableau 3 disponibles au niveau du laboratoire HUPP PHARMA, sont conservées dans des cryotubes stériles de 2 ml contenant un milieu conservateur et des Cryobilles imprégnées de la souche à une température de -22°C dans le congélateur, ces cryobilles permettent :

- Une conservation et un stockage de 24 mois ;
- L'obtention de jusqu'à 25 répliques d'une même génération microbienne ;
- D'éviter la formation de glace à la récupération ;
- De minimiser le risque de contaminations croisées.

Et dans le but de confirmer leur viabilité, l'absence de mutation pour les utiliser on procède à une mise en culture de ces dernières.

2-1-Mise en culture des souches de référence

✓ **Méthodologie**

En travaillant sous PSM, sur milieu préalablement coulé et solidifié, on prélève à l'aide d'un curdent stérile un cryobille de son cryotube, puis on ensemence avec par la méthode des quadrillons.

- On réalise la même procédure pour le répliquât de chaque souche et on incube à l'étuve pendant 24h.

- Les milieux utilisés pour la réactivation des différentes souches sont :

→ **Le TSA** pour les bactéries incubées à une température de 35,5°C.

→ **Le Sabouraud** pour les levures et moisissures incubées à une température de 22,5°C.

2-2-Les dilutions des souches

Au niveau du laboratoire HUPP PHARMA, les analystes ont déjà validé les dilutions contenant un nombre de colonie inférieure à 100 UFC pour chaque souche de référence, donc on a réalisé des dilutions en se basant sur les résultats déjà validés (voir tableau 3).

Tableau 3 : Les souches microbiennes de références utilisées et leurs dilutions validées

La souche utilisée	La référence	La dilution validée
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	10-4
<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	10-4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027	10-4
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC16404	10-5
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC14028	10-7
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633	10-4
<i>Escherichia coli</i>	ATCC8739	10-6

✓ **Méthodologie**

A l'aide d'une anse de platine flambée et refroidie, on prélève une petite partie d'une colonie de la souche et on l'introduit dans le tube de la solution mère (SM) qu'on homogénéise à l'aide du vortex ; et on prélève depuis cette SM 1 ml à l'aide d'une pipette et on le transfère dans le tube de la dilution suivante, on vortex à la fin selon le tableau 3 ; On procède à un ensemencement en profondeur en prélevant 1 ml de la dernière dilution et on le transfère dans une boîte de Pétri vide préalablement renseignée (Nom de la souche, milieu, dilution et date) ; On coule le milieu dans la boîte et on homogénéise le tout en faisant des formes de 8 sur la paillasse ; A la fin, on incube à la température spécifique pour chaque milieu.

2-3-Identification des souches microbiennes

2-3-1-Identification macroscopique

Cette identification se fait à l'œil nue à proximité du bec bunsen, ce test permet de constater l'aspect des colonies obtenues sur milieux solide, et ainsi déterminer :

→ Pour les bactéries

- Le nombre ; La couleur ; La taille (ponctiforme : taille < mm / petites : Diamètre de 1 à 2 mm / moyennes : diamètre de 3 à 5 mm / grosses : diamètre > 5 mm) ; La forme (ronde / irrégulière / en étoile / envahissante) ; vagues concentriques ; L'allure des contours (régulier / irrégulier) ; Aspect de la surface (lisse / rugueuse) ; Le relief (bombé / semi-bombé / plat / en vague concentrique) ; L'allure des contours (régulier / irrégulier) ; Aspect de la surface (lisse / rugueuse) ; L'opacité (opaque / translucide) ; La consistance (crémeuse / muqueuse / sèche).

→ Pour les champignons

- Recto : forme, texture, couleur, caractère envahissant ou non.
- Verso : couleur, l'aptitude à pénétrer dans la gélose.

2-3-2-l'identification microscopique

Cette identification est basée sur la morphologie des cellules microbiennes et leur mode de regroupement observés par microscope optique.

- **Observation à l'état frais**

Une observation à l'état frais permet d'examiner la mobilité des bactéries et des levures et d'en déceler la forme.

Cette technique est utilisée pour la levure *Candida albicans*.

✓ **Technique utilisée**

On dépose une petite goutte d'eau purifiée sur la lame ; on prélève ensuite avec l'anse de platine une moitié de la colonie de la levure qu'on étale sur la goutte d'eau et on l'y

incorpore progressivement pour avoir une suspension homogène ; qu'on observe à l'objectif 40 après dépôt de la lamelle sur la lame ;

- **Observation avec une coloration**
 - **Coloration de Gram (pour les bactéries)**

Les bactéries présentent toutes une paroi constituée d'une substance, la muréine qui est un peptidoglycane. Celle-ci est recouverte par une membrane externe chez les bactéries Gram-, tandis que les bactéries à Gram+ sont dépourvues. Cette paroi de par son organisation permet de les classer soit dans les Gram+ ou les Gram-.

Au terme du processus de coloration, les bactéries dites « Gram négatif » apparaissent rose tandis que les bactéries dites « Gram positive » sont colorée en bleu foncé / violet (Baladent, 1997).

✓ **Matériels utilisés**

Lames stériles ; Lamelles ; Pince à lames ; Pissette d'eau purifiée ; Pissette d'alcool absolu ou alcool-acétone ; Anse de platine ; Bec Bunsen ; Chronomètre ; Microscope optique.

✓ **Réactifs utilisés**

Violet de gentiane ; Liquide de lugol ; Solution de fuchine ; Bleu de lactophénol ; Huile à immersion.

✓ **Technique utilisée**

La réalisation d'un frottis :

Sur une lame, on ajoute une goutte d'eau et à proximité du bec bunsen on prélève à l'aide d'une anse de platine une partie d'une colonie bien isolée de la bactérie qu'on étale sur la lame puis on fixe le frottis en le passant sur la flamme du bec à l'aide de la pince pendant environ 10 minutes (jusqu'à séchage du frottis).

La réalisation de la coloration :

La lame contenant le frottis est déposée dans le bac du violet de gentiane pendant 1 minute puis rincée avec de l'eau purifiée ; la même procédure pour le réactif lugol puis on décolore avec de l'alcool pendant 30 secondes et on remet dans le bac de fuchine pendant une minute après rinçage et séchage avec du papier absorbant , une goutte d'huile d'immersion est déposée , une observation avec l'objectif 100 est réalisée .

La même procédure est réalisée pour toutes les bactéries qui sont : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*.

- **Coloration simple avec bleu de lactophénol**

- ✓ **Technique utilisée**

La réalisation du frottis et sa coloration :

On met une grosse goutte de bleu de lactophénol sur la lame et on y dépose dessus l'*Aspergillus niger* qu'on incorpore délicatement et on dépose la lamelle et on réalise une observation microscopique à l'objectif 100 ;

Après chaque observation, on met les lames utilisées dans un bac pour un lavage et un dégraissage ultérieur.

Lavage et dégraissage des lames :

Cette solution a pour but de dégraisser les lames et d'éliminer l'huile à immersion. L'acide chlorhydrique permet de dissoudre les matières organiques. La solution obtenue est réutilisable pour d'autres lavages de lames déjà utilisées.

Pour le dégraissage et nettoyage des lames usagées, on a préparé une solution nettoyante composée de :

- 1 cm³ de détergente vaisselle ;
- 9 volumes de méthanol ;
- 1 volume d'acide chlorhydrique concentré.

On prépare la solution nettoyante dans un bac et après homogénéisation on dépose les lames usagées dedans. Après 24 heures on ressort les lames à l'aide d'une pince et on les rince avec de l'eau purifiée puis on les sèche avec un papier absorbant afin d'être réutilisées pour d'autres observations.

2-3-3-Identification biochimique par galeries Api

Pour l'identification biochimique des microorganismes, on a utilisé les galeries API (**Biomerieux, France**). Elles sont commercialisées en forme miniature prêtes à l'emploi conservées dans le réfrigérateur à une température de 2-8 °C, chaque boîte est munie de :

galeries API ; Boîtes d'incubation ; ampoules d'api AUX Medium ; Une notice ; Les fiches de résultats ; Un pack de McFarland : tubes de références d'opacité des suspensions bactériennes ; Les réactifs pour la lecture des résultats (tableau 4).

✓ Préparation de la galerie

- Réunir le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation et à l'aide d'une seringue remplir les alvéoles d'eau distillée afin de créer une atmosphère humide ;
- Renseigner sur la languette latérale de la boîte les informations de l'identification (Date / souche / dilution).

✓ Ensemencement de la galerie

- A proximité du bec bunsen avec une anse de platine, on prélève du milieu gélosé TSA contenant une ou plusieurs colonies selon le type de galerie (tableau 4, ci-dessous) ; et on réalise avec une suspension bactérienne en l'homogénéisant dans le tube d'API Medium.

*Pour certaines galeries la suspension doit avoir une opacité égale à un des tubes de référence McFarland (figure 3).



Figure 3: Standard des McFarland .

Inoculation de la galerie

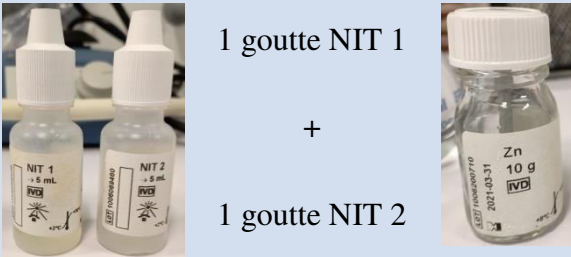
- Avec une seringue, on introduit la suspension bactérienne dans les puits de la galerie en évitant de faire des bulles (en inclinant la seringue) ;
- Les puits sont remplis comme suit :
 - **Test vide** : remplir tube et cupule ;
 - **Test encadré** : remplir tube et cupule en entier ;
 - **Test souligné** : remplir la cupule et ajout d'huile de paraffine pour créer une anaérobiose ;
 - **Autre tests** : remplir uniquement les puits
- On ferme la boîte et on incube dans l'étuve.

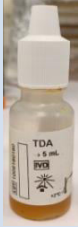




✓ **Lecture de la galerie**



*La lecture des réactions après incubation est réalisée visuellement pour les réactions spontanées, et justes après révélation par l'ajout des réactifs pour les réactions qui nécessitent des tests complémentaire.

*Pour certaines une lecture après 24H d'incubation est suffisante, pour d'autres une deuxième lecture de 48H est réalisée.

Tableau 4 : lecture des réactions de la galerie après les tests complémentaire

Test	Réactif ajouté	Lecture
Test NO ₃	 <p>1 goutte NIT 1 + 1 goutte NIT 2 + poudre de zinc si c'est(-)</p>	<p>après 5 minutes si la coloration est rouge le résultat est positif (+).</p> <p>si c'est incolore on ajoute 2-3 g de réactifs de Zn après 5 min : incolore : (+).</p>

Test	Réactif ajouté	Lecture
TDA	1 goutte du réactif TDA 	Immédiate : Couleur marron rougeâtre  (+)
Test TRP	1 goutte du réactif de James 	Immédiat : Couleur rose : (+)
VP	une goutte du VP1 + une goutte du VP2	Après 10 minutes : Couleur rose franche ou violette (+) 
IND	1 goutte du réactif de James	Immédiat : Couleur rose (+) 

Test	Réactif ajouté	Lecture
Test d'assimilation	Aucun	Un trouble exprime un résultat Positif (+) 
Test PAL	1 goutte du ZYM A + 1 goutte du ZYM B 	Après 10 min : Violette : (+)

✓ **Interprétation des résultats de la galerie**

L'interprétation des résultats se fait en se référant au tableau de lecture.

- On détermine la positivité et la négativité de chaque test en se basant sur les tableaux indiqués dans la notice des galeries (voir annexe) ;
- En remplissant une fiche de résultats (figure 4, ci-dessous) ; cela permet d'indiquer un code de 7 chiffres (code d'identification) qui correspond au genre du microorganisme à identifier à l'aide du logiciel d'identification (<https://apiweb.biomerieux.com/login>).

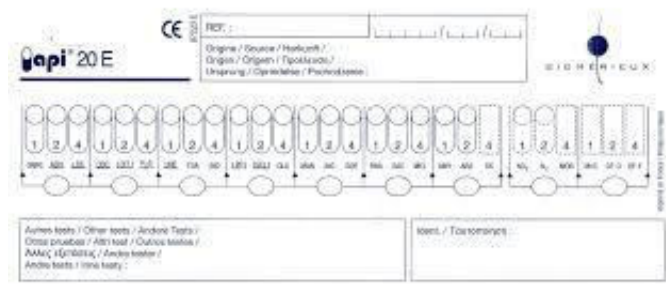


Figure 4 : Fiche de résultats de la galerie API

Tableau 5 : Les différents types de galeries API utilisée.

Galerie	Prélèvement des colonies	Ensemencement de la galerie	Incubation	Tests pour la lecture
<p>20 E :</p> <p>dédiée à l'identification des bacilles Gram– appartenant à la famille des entérobactéries (<i>E. coli</i> et <i>Salmonella</i>).</p>	<p>1 seule colonie bien isolée d'une culture jeune 18-24h.</p> <p>Pour inoculer la galerie 20 E</p> <p>Une suspension d'opacité égale à 2 de McFarland.</p> <p>(inoculer seulement les 12 premiers tests).</p>	<p>Ensemencement dans un API Medium 5 ml.</p>	<p>35,5 °C</p> <p>24h</p>	<p>TDA</p> <p>IND</p> <p>VP</p>
<p>20 NE :</p> <p>dédiée à l'identification des bacilles Gram– non entérobactéries et non fastidieux (<i>Pseudomonas</i> et <i>Acinetobacter</i>).</p>	<p>1 à 4 colonies de morphologie identique.</p>	<p>Ensemencer dans un Api 2 ml et remplir les tubes des 8 premiers tests, ensuite transférer 20 µl de cette suspension dans un tube d'API AUX Medium 7 ml et remplir avec les puits restants.</p> <p>Suspension d'opacité égale à 0.5 de McFarland.</p>	<p>31 °C</p> <p>24h</p>	<p>NO₃</p> <p>TRP</p> <p>Test d'assimilation</p>

<p>Api Staph : dédiée à l'identification des genres <i>Staphylococcus</i>, <i>microcoques</i> et <i>Kocuria</i>.</p>	<p>Colonies préalablement confirmées Gram +.</p>	<p>Ensemencer dans un tube d'Api staph medium 6 ml. Suspension d'opacité égale à 0.5 de McFarland.</p>	<p>35,5 °C 24h</p>	<p>VP NIT PAL</p>
<p>Api Candida : dédiée à l'identification des levures.</p>	<p>Une ou plusieurs colonies identiques et bien isolées.</p>	<p>Ensemencer dans un tube d'Api NaCl medium 2 ml. Suspension d'opacité égale à 3 de McFarland.</p>	<p>35,5 °C 24h</p>	<p>/</p>
<p>Api 50 CH* : utilisée en combinaison avec API 50 CHL Medium pour l'identification des <i>Lactobacillus</i> et en combinaison avec API 50 CHB/E Medium pour l'identification des <i>Bacillus</i>.</p>	<p>Prélever plusieurs colonies identiques : pour inoculer la galerie 50 CH. - Une suspension d'opacité égale à 2 de McFarland dans l'ampoule d'API 50 CHB/E Medium.</p>	<p>API 50 CHB/E Medium (10 ml) + API NaCl 0, 85% Medium (5 ml).</p>	<p>31 °C 24h et 48h</p>	

Remarque : Les prélèvements des colonies ont été réalisés sur des milieux gélosés aux dilutions préalablement validées.

3- Les tests réalisés sur les milieux de culture

En se basant sur les prescriptions de la pharmacopée, deux tests ont été réalisés : test de stérilité et test de fertilité.

3-1-Test de fertilité

Ce test nous renseigne sur la fertilité des milieux préparés pour s'assurer de la viabilité des microorganismes dans ces derniers. La fertilité des milieux de culture spécifiques se traduit par son pouvoir à faire pousser la souche recherchée et à inhiber une autre. L'essai de fertilité est satisfaisant si une croissance est observée pendant la durée d'incubation dans les milieux ensemencés et celui d'inhibition par son absence.

A partir d'une culture jeune de la souche de référence spécifique, on procède à sa dilution donnant une boîte avec au maximum 100 UFC (tableau 6).

Pour les milieux liquides :

- On transfère 1 ml de la dilution vers le flacon de milieu liquide et incubé à température et temps appropriés.

Pour les milieux solides :

- On procède à un ensemencement en stries et on incube.

Pour cela on procède à des tests de fertilité et d'inhibition (tableau 6).

✓ Le milieu utilisé pour le dénombrement de la flore totale (TSA) a été ensemencé avec une souche bactérienne au choix, on l'a ensemencé avec *Staphylococcus aureus*.

✓ Le milieu utilisé pour le dénombrement des levures et moisissures a été ensemencé avec *candida albicans*.

Pour les milieux sélectifs, chaque milieu selon sa souche spécifique.

3-2-Test de stérilité

Afin de s'assurer de la stérilité des milieux préparés utilisés tout au long de notre analyse microbiologique, nous avons procédé à leur incubation vides en les incubant à température et durée appropriées pour chaque milieu en coulant chaque milieu dans une boîte de Pétri. Après incubation ces milieux ne doivent présenter aucune vie microbienne, dans le cas contraire le milieu n'est pas stérile et ne doit pas être utilisé.

3-3-Validation et estimation de la croissance microbienne de l'eau peptonée

Afin de s'assurer de la fiabilité des résultats, on a aussi procéder à la validation de la conformité de l'eau peptonée utilisée durant l'analyse du produit (préparation des échantillons, dilution) en estimant sa croissance microbienne par spectrophotométrie.

✓ **Méthodologie**

Après avoir rempli 7 tubes à essai qui correspondent aux souches de références avec 9 ml d'eau peptonée à validée sous PSM, nous avons réalisé un ensemencement avec l'anse de platine en prélevant à partir des milieux TSA et Sabouraud contenant les souches préalablement réactivée une colonie bien isolée, après homogénéisation de chaque tube on a procédé à la mesure de l'absorbance à $t=0$, $t=24$ h , $t=48$ h dans une longueur d'onde égale à 600 nm , les résultats sont représentés dans un tableau qui figure dans la partie résultat .

Tableau 6 : Les milieux de culture testés.

Milieu de culture	Quantité en g/L	pH	Stérilisation	Souche	Dilution	Propriétés	Température d'incubation
Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja (TSA)	47,17g	7,2±0,2	121°C pendant 15 minutes	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ⁻⁴	Fertilité	30-35°C
Milieu liquide aux peptones de caséine et de soja (TSB)	35g	7,3±0,2	121°C pendant 15 minutes	<i>Bacillus subtilis</i>	10 ⁻⁴	Fertilité	30-35°C
Milieu gélosé Sabouraud	65g	5,6±0,2	121°C pendant 15 minutes	<i>Candida albicans</i>	10 ⁻⁴	Fertilité	20-25°C
Milieu Cétrimide	45,3g + 10ml glycérol	7,2±0,2	121°C pendant 15 minutes	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 ⁻⁴	Fertilité	30-35°C
				<i>Escherichia coli</i>	10 ⁻⁶	Inhibition	30-35°C
Milieu Mannitol Salt Agar	111,02g	7,4±0,2	121°C pendant 15 minutes	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ⁻⁴	Fertilité	30-35°C
				<i>Escherichia coli</i>	10 ⁻⁶	Inhibition	30-35°C
Milieu XLD Agar	55,4g	7,4±0,2	/	<i>Salmonella typhi</i>	10 ⁻⁷	Fertilité	30-35°C
Milieu Macconkey Agar	50g	7,1±0,2	121°C pendant 15 minutes	<i>Escherichia coli</i>	10 ⁻⁶	Inhibition	30-35°C
Milieu Macconkey Broth	35g	7,3±0,2	121°C pendant 15 minutes	<i>Escherichia coli</i>	10 ⁻⁶	Fertilité	42-44°C
Milieu Rappaport Soy broth	26,6g	5,2±0,2	115°C pendant 15 minutes	<i>Salmonella typhi</i>	10 ⁻⁷	Fertilité	30-35°C
				<i>Escherichia coli</i>	10 ⁻⁶	Inhibition	30-35°C

4-L'analyse des produits non obligatoirement stériles

Le but de chaque analyse est de s'assurer que le produit est conforme aux normes sur le plan microbiologique prescrit sur les données de la pharmacopée européenne 9^{ème} édition. Ces essais permettent de contrôler l'absence ou la présence limitée de microorganismes spécifiés et donc à déterminer si une substance ou préparation satisfait une spécification préétablie en matière de qualité microbiologique. En obéissant aux conditions internes du laboratoire, on a pu lancer l'analyse de 26 lots selon leur forme galénique dont :

- **Forme granulée : 12 lots**

Des médicaments granulés pour suspension buvable en flacon qui est un antispasmodique musculotrope.

- **Gélules : 2 lots dont 1 lot ayant des propriétés hypoglycémiantes et 1 lot d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (ANS).**

- **Comprimés : 7 lots**

Des comprimés enrobés ayant des propriétés antiasthéniques, aussi pelliculés ayant des propriétés antidiabétiques conditionnées dans des blisters répartis en 1 lot in process (en cours de fabrication) et 6 lots produits finis.

- **Matière première : 1 lot**

La vitamine B₁₂, également appelée cobalamine, est une vitamine hydrosoluble essentielle au fonctionnement normal du cerveau (elle participe à la synthèse des neurotransmetteurs) et du système nerveux (indispensable au maintien de l'intégrité du système nerveux).

- **Excipients : 4 lots**

Le saccharose (ou le sucre blanc) est très utilisé dans de nombreuses formes galéniques comme diluant et comme édulcorant dans diverses formes solides et liquides destinées à la voie orale.

L'analyse a été effectuée selon le planning suivant :

Tableau 7 : Planning des différentes analyses réalisées.

Forme du produit	24/03/19	25/03/19	31/03/19	01/04/19	07/04/19	08/04/19
Forme granulée	1 lot : analyse normale (1). 1 lot : analyse normale (2). 1 lot : analyse sans bec bunsen (3).	1 lot : analyse sans bec bunsen (4). 1 lot : contaminé avec <i>S. thyphi</i> (5). 1 lot : contaminé avec : <i>E.coli</i> , <i>P.aeroginosa</i> , <i>S.thyphi</i> , <i>S.aureus</i> et <i>C. albicans</i> (6).	1 lot : analyse normale (7). 1 lot : analyse normale (8). 1 lot : contaminé avec <i>S.aureus</i> (9).	1 lot : analyse sans bec bunsen (10). 1 lot : analyse sans bec bunsen (11). 1 lot : contaminé avec : <i>E.coli</i> et <i>.thyphi</i> (12).		
Gélule				1 lot : analyse normale (13).	1 lot : analyse normale (14).	
Comprimé (in process)					1 lot : analyse normale (15).	
Comprimé (produit fini)				1 lot : analyse normale (16). 1 lot : analyse normale (17).	1 lot : analyse normale (18). 1 lot : contaminé avec : <i>B.subtillus</i> , <i>P. aeroginosa</i> et <i>C.albicans</i> (19).	1 lot : analyse normale (20). 1 lot : analyse sans bec bunsen (21).
Matière première				1 lot : analyse normale (22).		
Excipient			1 lot : analyse normale (23). 1 lot : analyse sans bec bunsen (24). 1 lot : contaminé avec : <i>E.coli</i> , <i>S. thyphi</i> et			1 lot : analyse normale (26)

		<i>S.aureus</i> (25).			
--	--	-----------------------	--	--	--

✓ **Milieux de cultures**

Les milieux préalablement prouvés fertiles sont :

- **les milieux liquides** : TSB, Rappaport et Macconkey Broth.
- **Les milieux solides** : TSA, Sabouraud, Cétrimide, Mannitol, XLD et Macconkey Agar.

4-1-Préparation de l'échantillon

La méthode de préparation des échantillons dépend de la forme du produit à examiner. Toute fois l'analyse en elle-même qui consiste en le dénombrement et la recherche des germes spécifiques reste identique pour toutes les formes.

4-1-1-Prélèvement

Le prélèvement des échantillons varie en fonction de la forme du produit à analyser (tableau8).

Tableau 8 : Mode de prélèvement des différentes formes galéniques utilisées.

Forme du produit	Contenant	Mode de prélèvement
Granulés	Flacon	Verser à partir du flacon
Comprimés et gélules	Blister	Ouvrir le blister et laisser tomber le médicament
Matières premières et excipients	Sac à double emballage	cuillère stérile

4-1-2-L'échantillonnage

La préparation des échantillons représentatifs de chaque lot a été réalisée ainsi :

- Peser l'erenmeyer vide stérile (couvert par du papier aluminium), tarer ;
- A côté du bec bunsen, peser 10g du produit à analyser ;
- Compléter par de l'eau peptonée jusqu'au trait jaugé ;
- Vortex le tout pour une dissolution complète. C'est notre solution mère

Il est à noter que la différence par rapport à la forme granulée, c'est que l'enrobage pour les comprimés et la capsule pour les gélules prennent plus de temps pour se dissoudre, Pour ce fait, une étape supplémentaire a été réalisée. Elle consiste à mettre l'erlen dans un bain-marie pour accélérer le processus de la dissolution et ce après l'étape d'ajout d'eau péptonée.

4-2-Dénombrement des germes viables totaux

Les différentes étapes ont été réalisées selon l'énoncé de la pharmacopée 9^{ème} édition.

4-2-1-Préparation des dilutions

Pour chaque échantillon et à partir de la solution mère, on réalise 3 dilutions : 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} dans des flacons de 9ml d'eau péptonée.

4-2-2-Recherche des bactéries viables totaux

- On transfère 1 ml de la solution mère à l'aide de la pipette graduée dans une boîte de Pétri ;
- On effectue un ensemencement en profondeur en coulant le milieu TSA ;
- On réalise la même chose pour les dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} ;
- Les boîtes sont incubées dans l'étuve à 30-35°C pendant 3 à 5 jours.

4-2-3-Recherche des levures et moisissures

- Un ensemencement en profondeur est réalisé avec le milieu Sabouraud pour les dilutions 10^{-1} et 10^{-2} ;
- Les boîtes sont incubées dans l'étuve à 22,5°C pendant 5 à 7 jours

- Les différentes boîtes de Pétri sont agitées manuellement en faisant des cercles et des formes de 8 sur la paillasse afin d'homogénéiser le mélange.

4-3- Recherche des microorganismes spécifiques

✓ **Enrichissement**

- On transfère 10ml de la SM avec une seringue dans 90ml du milieu TSB. Après agitation, on incube pendant 24 heures dans l'étuve à 30-35°C.

Après 24 heures d'incubation, on procède à la recherche des germes suivants :

4-3-1-Recherche de *Staphylococcus aureus*

A partir du milieu TSB incubé et à l'aide d'une anse de platine devant le bec bunsen, on réalise un ensemencement en surface sous forme de stries sur milieu Mannitol Salt Agar qui a été préalablement coulé et solidifié sur boîte de Pétri. Incuber à 35,5°C pendant 18-72h.

4-3-2 -Recherche des *Pseudomonas aeruginosa*

On réalise un ensemencement en surface sur milieu gélosé Cétrimide à partir du milieu TSB. Incuber à 35,5°C pendant 18-72h.

4-3-3- Recherche de *Candida albicans*

On réalise un ensemencement en surface sur milieu gélosé Sabouraud à partir du milieu TSB, Incuber à 35,5°C pendant 24-48h.

4-3-4-Recherche des *Salmonella thyphimurium*

✓ **Enrichissement**

On prélève 1ml du TSB avec une seringue jetable et on le transfère dans un flacon de 100ml contenant du milieu Rappaport. On incube pendant 24 heures dans l'étuve à 30-35°C.

✓ **Isolement**

Après 24 heures et avec une anse, à partir du milieu Rappaport, on réalise un ensemencement en surface sur milieu XLD .Incuber à 30-35°C pendant 18-48h.

4-3-5 Recherche d'*Escherichia coli*

✓ **Enrichissement**

On transfère 1ml du TSB avec une seringue dans un flacon qui contient 100ml de Macconkey broth. On incube pendant 24 heures dans l'étuve à 30-35°C.

✓ **Isolement**

Après 24 heures un ensemencement en surface sur milieu Macconkey est réalisé à partir du milieu Macconkey broth (figure 20, ci-dessous). Incuber à 43°C pendant 18-72 h.

✓ **Lecture**

Pour chaque milieu d'enrichissement ou d'isolement, on réalise une lecture de 24 heures puis une lecture de 48 heures.

Ces analyses ont été réalisées dans diverses conditions :

- Une asepsie totale ;
- Sans bec bunsen dans le but de voir l'influence d'une probable coupure de gaz au moment de l'analyse ;
- Une contamination volontaire afin de visualiser son aspect.

Chapitre 03 :

Résultats et discussion

1-Résultats de confirmation d'indentification des souches de référence

Ci-dessous les résultats de la mise en culture des souches de référence sur milieu TSA pour les bactéries et milieu Saboraud pour levures et moisissures.

1-1-*Staphylococcus aureus*

- **Identification macroscopique**



Figure 5 : Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* sur milieu TSA après 24h d'incubation.

On observe des colonies blanches à jaunes rondes de petite taille, à contour régulier, bombées, crémeuses, lisses et opaques.

Nombre : 203

- **Identification microscopique**

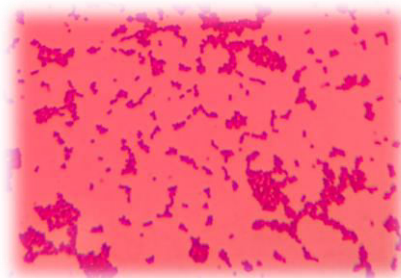


Figure 6 : Aspect de *Staphylococcus aureus* sous microscope optique (Grossissement $\times 100$).

On observe des cocci regroupées en amas colorés en violet ; *Staphylococcus aureus* est de gram +.

Et les *Staphylocoques* sont des cocci à Gram positif, et sur les cultures en milieu solide, ils se disposent en amas irréguliers polyédriques, évoquant l'aspect caractéristique de "grappes de raisin" (Fauchere, 2002 ; El Kouir, 2003).

▪ Identification biochimique

La lecture a été réalisée après ajouts de réactifs :

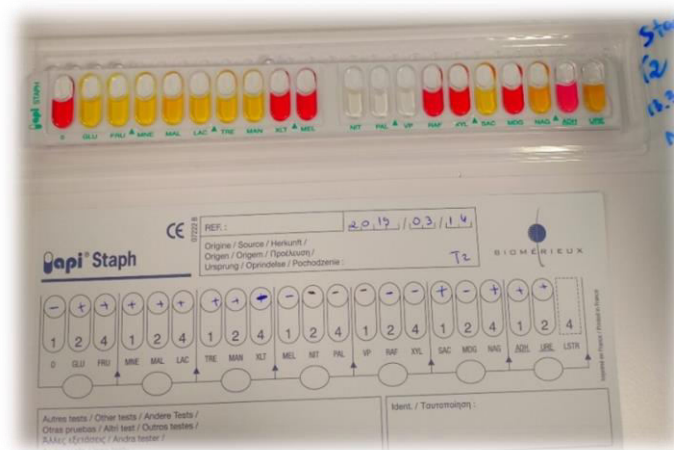


Figure 7 : Api Staph après incubation avec sa fiche de lecture.

Staphylococcus aureus est XLT ,MEL , RAF ,XYL , SAC ,DG ,NAG, ADH, URE (+)

Elle ne dispose pas de phosphate alcaline mais produit de l'acétyl méthyl-carbinol.

La souche ATCC6538 au code identifiant 6736153 est à 97,7% un *Staphylococcus aureus*.

1-2-*Candida albicans*

- Identification macroscopique



Figure 8 : Aspect macroscopique de *Candida albicans* sur milieu Saboraud après 24h d'incubation.

On observe des petites colonies blanches rondes en surface et sous forme d'une étoile en profondeur, Certaines sont bombées et d'autres sont en vagues concentriques. Elles sont irrégulières, lisses, opaques et crémeuses.

Nombre : 89

- Identification microscopique

Au niveau microscopique, le *C. albicans* peut se présenter sous forme de levures (**Berman et Sudbery, 2002**).

- Identification biochimique



Figure 9 : Api Candida après incubation.

La lecture se fait sans ajout de réactifs ; La couleur jaune des 3 premiers tests signifie une acidification du glucose, galactose et saccharose, contrairement à son absence pour les tubes 4 et 5, relatives au thréhalose et au raffinose. Elle est également productrice de B-galactosidase.

La souche de référence au numéro ATCC10231 et au code identifiant 7002 est à 91,4% une C.albicans

1-3-*Pseudomonas aeruginosa*

▪ Identification macroscopique

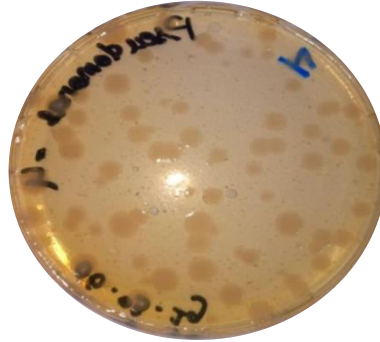


Figure 10 : Aspect macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu TSA après 24h d'incubation.

On observe de petites colonies blanches à jaunes, rondes, à contour régulier, bombées, lisses, opaques et crémeuses.

Nombre : 87

▪ Identification microscopique

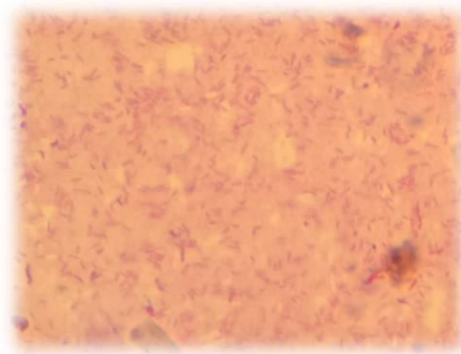


Figure 11 : Aspect de *Pseudomonas aeruginosa* sous microscope optique

(Grossissement $\times 100$).

On observe de longs bacilles , longs ,fins et droits , Regroupées ou isolées de couleur rose : *Pseudomonas aeruginosa* est gram négatif.

Ces résultats sont soutenus par (Lilet *et al.*, 1983) les décrivant comme un bacille fin Gram négatif. Et sur gélose apparaissent des colonies de quelques millimètres de diamètre, plates ou surélevées, opaques, à surface assez dépolie, limitées par un bord régulier ou finement dentelé.

▪ Identification biochimique

La lecture a été faite après l'ajout des réactifs.

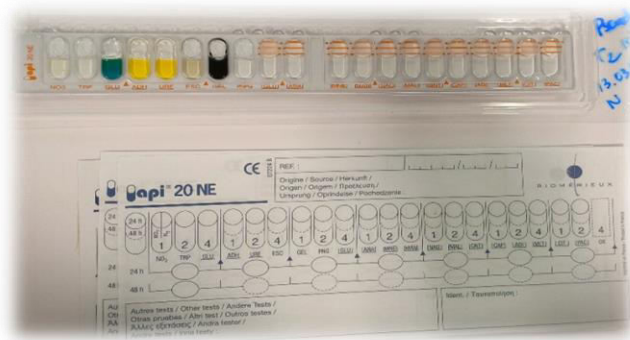


Figure 12 : Api 20 NE après incubation.

Selon les résultats de la galerie API 20 NE, Les Caractères biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa* sont :

_Réduction des nitrites en nitrates .

_Hydrolyse de la protéase .

_Assimilation glucose ,mannitol , N-acétyl-Glucosamine,potassium gluconate ,acide adipique , acide caprique , malte et du trisodium citrate.

Donc la souche à la référence 1054576 révèle après lecture un code identifiant 1054576 et par lecture sur apiweb cette souche est à 99,9%

1-4-*Aspergillus niger*

▪ Identification macroscopique

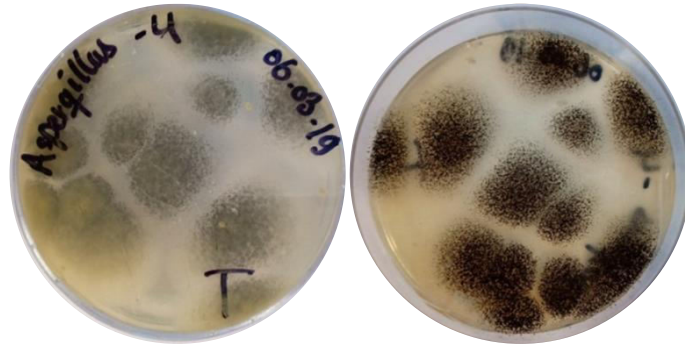


Figure 13 : Aspect macroscopique de l'*Aspergillus niger* sur milieu Saboraaud après 7 jours d'incubation.

On observe des colonies filamenteuses noires au centre et blanches aux alentours. Au revers, elles sont noires au milieu et blanches voir jaunâtres aux alentours.

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (Sabouraud). Elles montrent d'abord des colonies plates, formées de courts filaments aériens et blancs. Après, les colonies vont prendre leur teinte caractéristique selon les espèces (noire pour *Aspergillus niger*).

▪ Identification microscopique

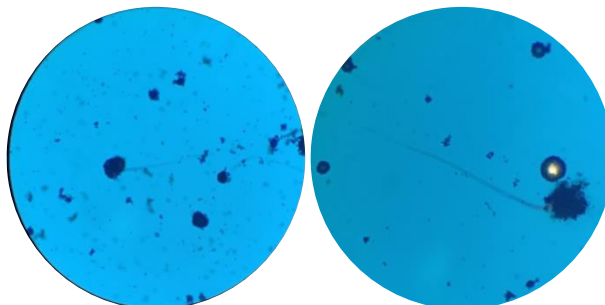


Figure 14 : Aspect de l'*Aspergillus niger* sous microscope optique après coloration au bleu de lactophénol (Grossissement $\times 10$).

On observe de longs mycéliums finissant avec une tête aspergillaire

1-5-Salmonella typhimurium

▪ **Identification macroscopique**

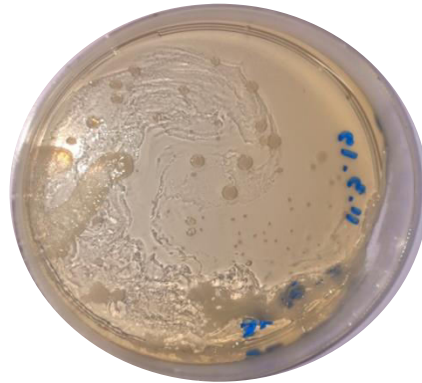


Figure 15 : Aspect macroscopique de *Salmonella typhimurium* sur milieu TSA après 24h d'incubation.

On observe de petites colonies rondes, bombées, lisses, transparentes, crémeuses, de couleur blanche et à contour régulier.

Nombre :

▪ **Identification microscopique**

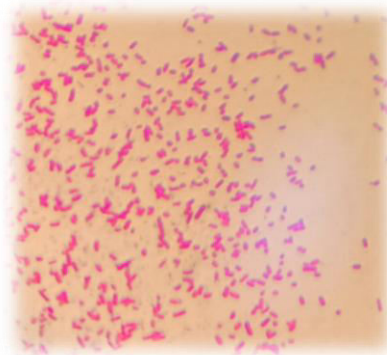


Figure 16 : Aspect de *Salmonella typhimurium* sous microscope optique (Grossissement $\times 100$).

On observe des batonnet roses : *Salmonella typhimurium* est gram négatif

Ces mêmes résultats sont observés par (Korsak *et al.*, 2004) qui décrit *Salmonella* comme est un bacille Gram négatif peu exigeant d'un point de vue nutritionnel .

▪ Identification biochimique

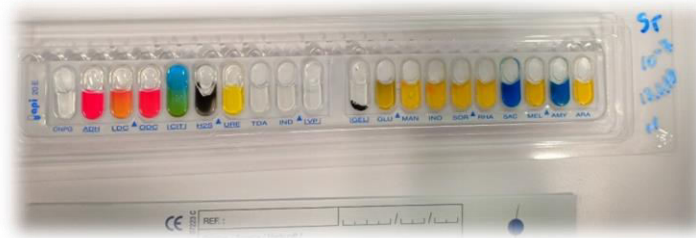


Figure 17 : Api 20E après incubation.

Le profil biochimique de *Salmonella typhi* d'après le résultat de la galerie est le suivant :

Elle possède de la B-galactosidase, de l'Arginine décarboxylase, de la lysine décarboxylase et de l'ornithine décarboxylase. Elle utilise également du citrate.

La coloration jaune des tests de 11 à 17 signifie l'utilisation de ce substrat comme source de carbone par cette bactérie.

L'identification biochimique révèle un pourcentage de 99,8% de ressemblance à *Salmonella typhimurium*

1-6-*Bacillus subtilis*

▪ Identification macroscopique



Figure 18 : Aspect macroscopique du *Bacillus subtilis* sur milieu TSA après 24h d'incubation.

On observe des petites et moyennes colonies blanches et irrégulières à contour irrégulier, de surface rugueuse, opaques sèches.

- **Identification microscopique**

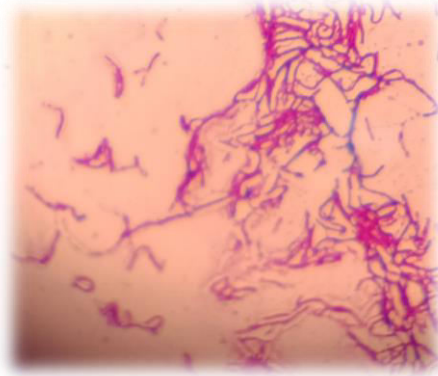


Figure 19 : Aspect de *Bacillus subtilis* sous microscope optique (Grossissement $\times 100$).

On observe de très longs bacilles de coloration rose : *Bacillus subtilis* est gram négatif

Ce même résultat est observé par (Prescott *et al.*, 2010) ; Les *Bacillus* sont des bactéries à Gram négatif en forme de bâtonnets (1,2 à 10 μ m de long)

- **Identification biochimique**



Figure 20 : Api 50 CH après incubation de 24 et 48 heures.

Api 50CH : Le virage du rouge au jaune du rouge de phénol contenu dans le milieu s'explique par la production d'une l'acidification pour les tubes de l'api 50 CHE , cette acidification se traduit par un virage du rouge au noir pour le test 25.

API 20 E : le *Bacillus subtilis* possède les enzymes B-galactosidase et la gélatinase.

L'interprétation des résultats nous fournit un code d'identification qui nous donne par la suite 98% d'identité par rapport à *Bacillus subtilis*

1-7-*Escherichia coli*

▪ Identification macroscopique

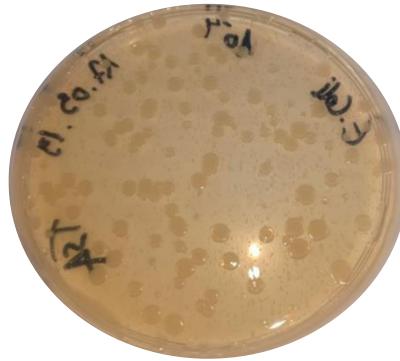


Figure 21 : Aspect macroscopique d'*Escherichia coli* sur milieu TSA après 24h d'incubation.

On observe des colonies blanches crème, grosses, rondes, bombées, lisses, opaques, et crémeuses et régulières.

▪ Identification microscopique

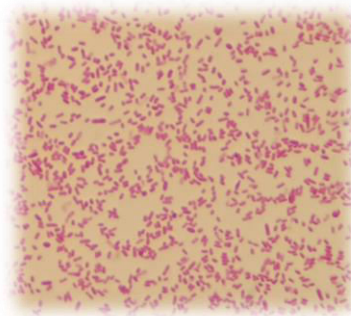


Figure 22 : Aspect d'*Escherichia coli* sous microscope optique (Grossissement $\times 100$).

L'aspect d'*E.coli* observé par microscope optique après coloration de gram révèle des bacilles courtes, regroupées à deux, en amas ou isolées ; *Escherichia coli* est gram -.

Et selon (Avril *et al.*, 2000) ; *E. coli* est une bactérie fine et allongée à extrémités arrondies et à gram négatif .

▪ Identification biochimique



Figure 23 : Api 20E après incubation.

E.coli utilise le glucose, mannitol, sorbitol, rutinose et l'arabinose comme substrats carbonnés, elle est indole + et possède la B-galactosidase, l'arginine hydrolase et l'oritidine décarboxylase comme enzymes.

D'après ces résultats la souche à la référence ATCC8739 est à 99,6% une *E.coli*.

Les résultats des galeries API confirme que les souches correspondent réellement à celle recherchées et sont apte à être utilisée pour l'analyse.

2-Test de fertilité et stérilité des milieux de culture

2-1-Test de fertilité

- Macconkey Broth

Fertilité par *Escherichia coli* (+)



Figure 24 : Fertilité du milieu Macconkey Broth après 24 heures d'incubation.

On observe un virage de couleur du rouge au jaune-orange et une opacité du milieu ; ce virage de couleur de l'indicateur pH (pourpre de bromocrésol) se traduit par l'acidification du milieu qui est due à la fermentation du lactose (Mcconkey *et al.*, 1901).

La présence de la bile inhibe la croissance des microorganismes à Gram positif, ce qui confirme notre observation microscopique de la souche *E. coli*.

Inhibition des *Staphylococcus aureus* (+)



Figure 25 : Inhibition du milieu Macconkey Broth après 24 heures d'incubation.

On observe aucun changement de couleur ni d'opacité prouvant l'absence de croissance bactérienne ; le milieu est conforme.

- **Macconkey Agar**

Fertilité par *Escherichia coli* (+)



Figure 26 : Fertilité du milieu Macconkey Agar après 24 heures d'incubation.

On observe sur la figure des colonies roses entourées d'un halo opaque de couleur rouge et un dépôt au fond de la boîte.

La couleur rose ou rouges des colonies révélées en présence du rouge neutre est due à la fermentation du lactose en acide (Mcconkey *et al.*, 1901). Et selon (Haouzi, 2013) *E. coli* est lac + ce qui confirme notre résultat.

- **Milieu Rappaport Soy Broth**

Fertilité par *Salmonella typhi* (+)



Figure 27 : Fertilité du milieu Rappaport Soy Broth après 24 heures d'incubation.

On observe un virage de couleur du milieu d'un bleu foncé à un bleu-vert très clair et un dépôt blanc au fond du flacon.

Le faible pH du milieu associé à la présence de vert de malachite et à la forte concentration de chlorure de magnésium qui augmente la pression osmotique, sont sélectifs pour les *Salmonella* sp et la croissance est révélée par un aspect laiteux du milieu ou par une turbidité (Peterz, 1989).

Inhibition des *Staphylococcus aureus* (+)



Figure 28 : Inhibition du milieu Rappaport Soy Broth après 24 heures d'incubation.

On observe Aucun changement de couleur ni de dépôt au fond du flacon, donc aucune pousse de *Staphylococcus aureus* sur ce milieu n'est détectée.

Ces résultats sont due à la forte concentration en chlorure de magnésium ainsi que la présence de vert de malachite ralentissent la croissance de germes autres que les *Salmonelles* (Rappaport *et al.*, 1956).

- Milieu XLD Agar

Fertilité par *Salmonella typhi* (+)



Figure 29 : Fertilité du milieu XLD Agar après 24 heures d'incubation.

On observe sur le milieu XLD Agar de colonies noires, lisses, petites, bombées et régulières.

Sur XLD, les colonies de *Salmonella* sont rouges avec un centre noir (AFNOR, 2008) et ce par le pouvoir de la bactérie de decarboxyler la lysine par l'intermédiaire de l'enzyme, ce qui augmente le pH du milieu donc l'indicateur coloré ne change pas de couleur, de plus *Salmonella* produit du sulfure d'hydrogène (H_2S) à partir du thiosulfate ce qui donne un précipité noir avec des sels ferriques (colonies noires)

- Milieu Sabouraud

Fertilité par *Candida albicans* (+)



Figure 30 : Fertilité du milieu Sabouraud après 24 heures d'incubation.

On observe des colonies petites, blanches à aspect crémeux semblables à ceux observés par (Haley *et al.*, 1980) ; Les *C. albicans* présentent une croissance faible à forte colonies de couleur blanche

- Milieu Cétrimide

Fertilité par *Pseudomonas aeruginosa* (+)



Figure 31 : Fertilité du milieu Cétrimide après 24 heures d'incubation.



Figure 32 : Fluorescence de *Pseudomonas aeruginosa* sous UV.

On observe des colonies transparent à vertes et cette pigmentation jaune à vert fluo mise en évidence sous UV, est due à la production de pigments fluorescents la pyoverdine et la pyocyanine (Gellen-Dutremer, 2007).

Inhibition des *Escherichia coli* (+)



Figure 33 : Inhibition d'*Escherichia coli* par le milieu Cétrimide après 24 heures d'incubation.

Aucune croissance microbienne n'est observée car la présence du cétrimide, qui est un composé ammonium quaternaire, agit comme inhibiteur d'une grande variété de germes y compris les espèces de *Pseudomonas* autres que *Pseudomonas aeruginosa* (Lowbury *et al.*, 1955).

▪ Milieu Mannitol

Fertilité par *Staphylococcus aureus* (+)



Figure 34 : Fertilité du milieu Mannitol après 24 heures d'incubation.

On observe un virage de couleur de l'indicateur coloré vers le jaune et des colonies de la même couleur. Ce virage de l'indicateur coloré au jaune est dû à l'acidification du milieu suite à une fermentation du mannitol par la souche qui est une aéro-anaérobies facultatifs, fermentant le mannitol (Fasquelle, 1974).

Inhibition des *Escherichia coli* (+)



Figure 35 : Inhibition du milieu Mannitol après 24 heures d'incubation.

Aucune croissance bactérienne n'est observée. En cause : la présence de chlorure de sodium qui inhibe la plupart des bactéries à Gram + et-, et ce milieu inhibe la croissance d'*E. coli* (Chapman *et al.*, 1945).

▪ **Milieu TSB**

Fertilité par *Pseudomonas aerogenosa* (+)



Figure 36 : Fertilité du milieu TSB après 24 heures d'incubation.

On observe un milieu troublé avec des bulles de gaz à la surface ces résultats sont les mêmes décrites par l'UPS ; la croissance dans le milieu est indiquée par la présence de turbidité, de taches ou de floculation et les résultats de croissance de *Pseudomonas* prévus sont une forte turbidité du milieu.

- Milieu TSA

Fertilité par *Escherichia coli* (+)

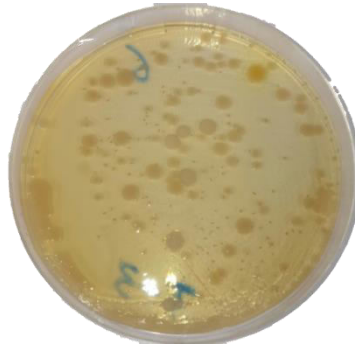


Figure 37 : Fertilité du milieu TSA après 48 heures d'incubation.

On observe une croissance microbienne sous forme de colonies blanches crémeuses, cette croissance témoigne de la fertilité du milieu et l'aspect figure dans la partie résultats d'identification d'*E.coli*.

2-2-Test de stérilité

Après incubation à une température et durée appropriées, les bouillons d'enrichissement ainsi que les milieux de culture se sont révélés stériles, aucune croissance microbienne, aucun changement de couleur ni de trouble ne sont décelés.

→ Stérilité des milieux d'enrichissements :

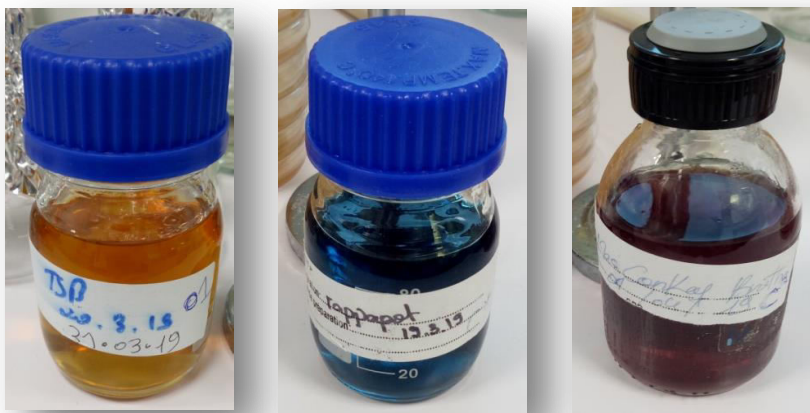


Figure 38: Résultats de stérilité des milieux liquides

→ Stérilité des milieux de culture gélosé :

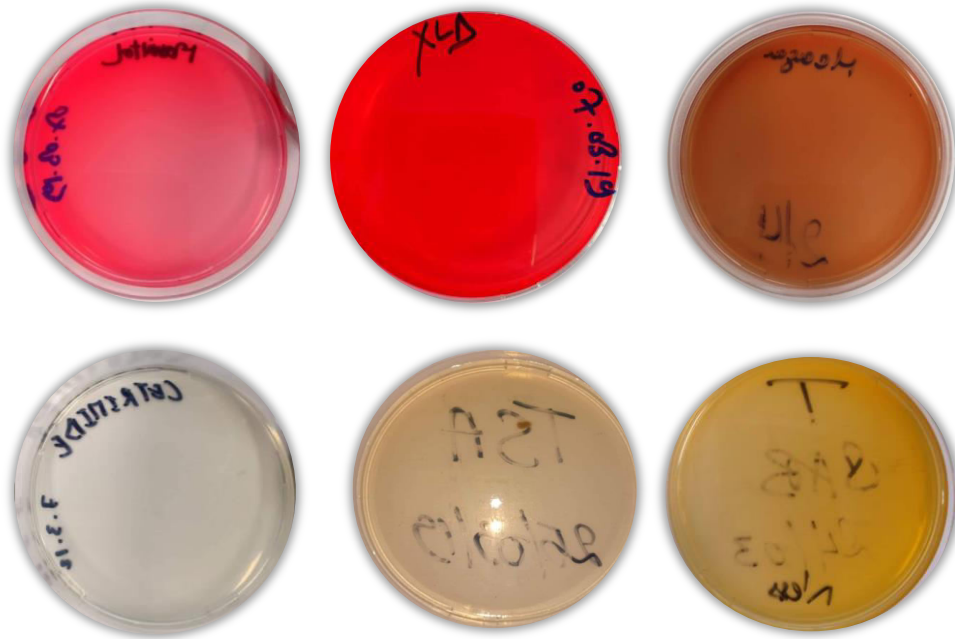


Figure 39 : Résultats de stérilité des milieux liquides

Le contrôle des propriétés nutritives ainsi que la stérilité des bouillons d'enrichissement et milieux de culture montre que ces derniers sont conformes et de bonne qualité nutritive, apte à être utilisés pour l'analyse des différents produits.

2-3-Validation et estimation de la croissance microbienne de l'eau peptonée

Tableau 9 : Mesure de l'absorbance de l'eau peptonée à une longueur d'onde de 600 nm .

La souche	T=0	T = 24h	T= 48h
<i>Escherichia coli</i>	0.026	0.81	0.410
<i>Candida albicans</i>	0.206	0.287	0.435
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.055	0.112	0.165
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.010	0.325	0.375
<i>Bacillus subtilis</i>	0.002	0.067	0.303
<i>Salmonella typhi</i>	0.025	0.255	0.345
<i>Aspergillus niger</i>	0.014	0.019	0.132

Résultats et discussion

On observe à partir du (tableau15) une augmentation significative de l'absorbance témoignant du développement de ces microorganismes sur ce milieu. Et on observe dans les tubes de la (figure 39) un trouble du milieu. Ces résultats démontrent alors que l'eau peptonée permet la croissance des différentes souches peu exigeantes et donc apte à être utilisé pour l'analyse.

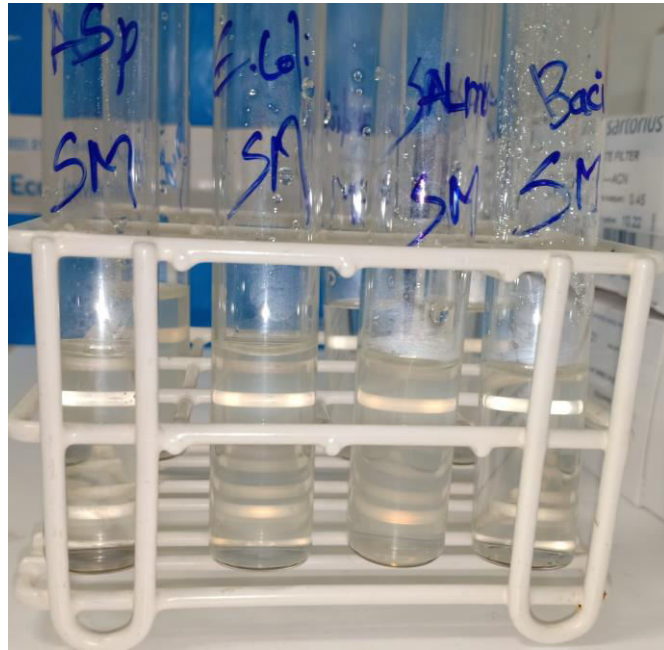


Figure 40 : Tubes d'eau péptonée après 24h d'incubation.

3-Analyse Produit

Les résultats de l'analyse du produit sont classés dans des tableaux selon les conditions de l'analyse.

3-1-L'analyse normale

Les résultats de l'analyse des produits réalisée dans des conditions d'asepsie sont représentés sur le tableau 18, ci-dessous :

- **R & D de B V T** : Recherche et dénombrement des bactéries viables totaux.
- **R & D de L & M** : Recherche et dénombrement des levures et moisissures.

Tableau 10 : Résultats d'analyse normale.

Lots	R & D de B V T	R & D de L & M	R de <i>S.aureus</i>	R de <i>P.aeruginosa</i>	R de <i>C.albicans</i>	R d' <i>E.coli</i>	R de <i>S.typhi</i>
1	abs	abs	abs	abs	abs	abs	abs
2	abs	abs	abs	abs	abs	abs	abs
7	abs	abs	abs	abs	abs	abs	abs
8	abs	abs	abs	abs	abs	abs	abs
13	abs	abs	abs	abs	abs	Colonies autres qu' <i>E.coli</i>	P
14	abs	abs	abs	abs	abs	abs	abs
15	abs	abs	abs	abs	abs	abs	abs
16	abs	abs	abs	abs	abs	abs	abs
17	abs	abs	abs	abs	abs	Colonies autres qu' <i>E.coli</i>	P
18	abs	abs	abs	abs	abs	abs	abs
20	abs	abs	abs	abs	abs	abs	abs
22	abs	Colonie poudreuse	abs	abs	abs	Colonies autres qu' <i>E.coli</i>	P
23	abs	abs	abs	abs	abs	abs	abs
26	abs	abs	abs	abs	abs	abs	abs

Les résultats de l'analyse normale des différentes formes et aspects nous révèlent qu'à l'exception des lots 13, 17 et 22 les produits sont conformes.

Résultats et discussion

Les lots 13, 17 et 22 sur le milieu Macconkey agar, montre des colonies d'aspect différent que celui qu'est censé avoir la souche *E.coli*.

Afin d'identifier l'agent contaminant, on a procédé à une identification macroscopique, microscopique et biochimique.

▪ L'aspect macroscopique



Figure 41 :Aspect macroscopique des colonies autres qu'*E.coli* sur milieu Macconkey agar des lots 13, 17 et 22.

Les colonies observées sont :

- Incolore pour le Lot 13 ;
- De couleur beige à crème pour les Lots 17 et 22.

▪ L'aspect microscopique (coloration de Gram)

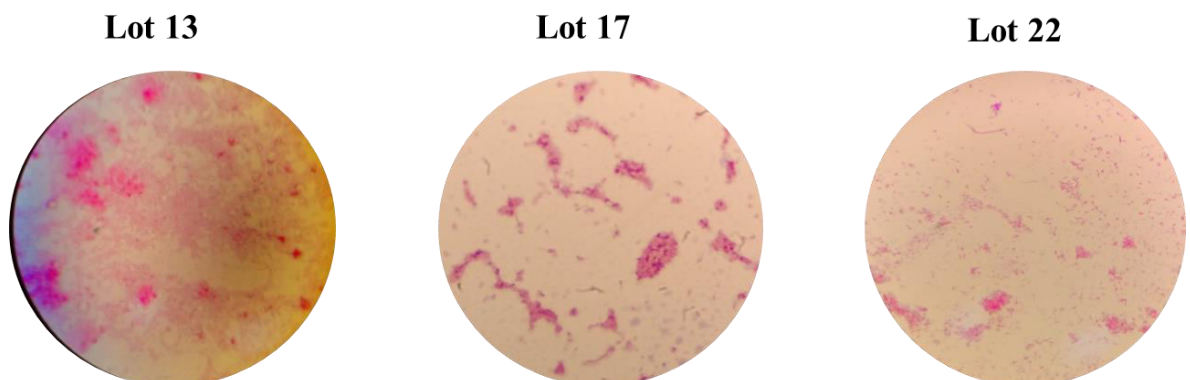


Figure 42 :Aspect microscopique après coloration de Gram des colonies autres qu'*E.coli* sur milieu Macconkey agar des lots 13, 17 et 22 au grossissement x100.

L'observation sous microscope nous a révélé des bacilles à coloration rose et donc des bactéries à Gram négatif.

▪ L'identification biochimique

Le choix de la galerie s'est fait en se basant sur les résultats de la coloration de Gram.

Type de la galerie utilisée : Api 20 E.

Lot 13

Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
<i>Salmonella</i> spp	99.8	0.47	TDA	0%		
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
<i>Salmonella enterica</i> ssp <i>arizonae</i>	0.1	0.0	ONPG 98%	TDA 0%	INO 1%	

Lot 17

Note(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
Taxons significatif(s)	70.8	0.1	ADH 75%	TDA 0%	INO 1%	
<i>Salmonella enterica</i> ssp <i>arizonae</i>	28.7	0.13	ONPG 1%	TDA 0%		
<i>Salmonella</i> spp						
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
<i>Serratia fonticola</i>	0.3	0.0	H2S 0%	TDA 0%	AMY 99%	

Lot 22

Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
<i>Salmonella</i> spp	99.9	0.52	RHA 86%	SAC 1%		
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
<i>Salmonella enterica</i> ssp <i>arizonae</i>	0.1	0.0	ONPG 98%	INO 1%	RHA 99%	SAC 1%

Figure 43 : Identification biochimique des souches autres qu'*E. coli* sur milieu Macconkey agar des lots 13, 17 et 22.

D'après les résultats obtenus la souche observée sur Macconkey agar pour les lots 13, 17 et 22 est *Salmonella* sp.

La croissance des Salmonelles sur le milieu Macconkey agar est sous forme de colonies transparentes à crèmes (**MacConkey, 1905**).

Résultats et discussion

L'analyse des 3 lots contaminés par *Salmonella* sp a été faite le même jour (01/04/2019) où on a contaminé le lot 12 par la même souche, on en déduit que la contamination est probablement une erreur de manipulation ; la paillasse mal désinfectée ou du matériel utilisé pour l'analyse.

Afin d'identifier la colonie de moisissure apparue sur le milieu de dénombrement des levures et moisissures, on a procédé à l'identification suivante :

▪ L'aspect macroscopique



Figure 44 : Observation macroscopique de la souche du lot 22 sur milieu Sabouraud (face et revers).

▪ L'aspect microscopique (coloration au bleu de lactophénol)

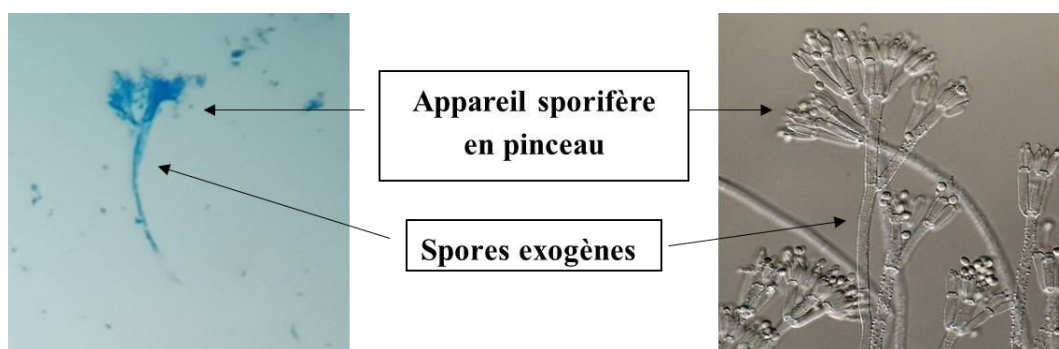


Figure 45 : Observation sous microscope optique de la souche du lot 22 (photo de référence *Penicillium subrubescens* by Jos Houbraken, CBS-KNAW FungalBiodiversity Centre, The Netherlands).

Tableau 11 : Résultats observation macro et microscopique du lot 22

Critères observés	Résultats obtenus	Hypothèses
Examen macroscopique de face	Aspect du mycélium : colonies velouteuses. Couleur du mycélium : blanche à l'extrémité et verte à l'intérieur.	L'observation macroscopique nous oriente vers le genre <i>Penicillium</i> .
Examen macroscopique du revers	Couleur : incolore à jaunâtre.	
Examen microscopique	On distingue bien les différentes parties du conidiospore. Les phialides, organes de fructification, libèrent les conidiospores (conidies). Cette production de spores nous indique que le mode de reproduction est asexué.	L'aspect microscopique nous confirme que c'est un <i>Penicillium</i> par l'aspect des conidiophores en pinceau spécifique à ce genre.

Les résultats d'analyse du lot 22 qui était une matière première mise en quarantaine prouvent que ce lot est contaminé et donc ne peut être utilisé.

3-2-L'analyse sans bec Bunsen

Tableau 12 : Résultats d'analyse sans bec bunsen.

Lots	R & D de B V T	R & D de L & M	R de <i>S. aureus</i>	R de <i>P. aeruginosa</i>	R de <i>C. albicans</i>	R de <i>S. typhi</i>	R d' <i>E. coli</i>
3	<100 UFC	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
4	Abs	<100 UFC	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
10	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
11	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
21	<100 UFC	<100 UFC	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
24	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs

Résultats et discussion

La présence de colonies des bactéries viables totaux, de levures et de moisissures sur les deux milieux TSA et Saboraud pour les lots 3,4 et 21 (<100 UFC) et l'absence des germes spécifiques observés dans les mêmes lots nous indique que la source de contamination est due à l'absence du bec stérilisant la zone de travail .On présume alors que cette contamination a pu parvenir de l'air, du manipulateur, de la zone de travail ou du matériel (erlens, pipettes, etc.) préalablement stérilisés.

3-3-Analyse avec contamination

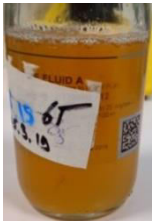



Tableau 13 : Résultats d'analyse avec contamination.

Lots	R & D des B V T	R & D de L & M	R de <i>S.aureus</i>	R de <i>P.aeruginosa</i>	R de <i>C.albicans</i>	R de <i>S.typhi</i>	R d' <i>E.coli</i>
5	<100 UFC	<100 UFC	Abs	Abs	Abs	P	Abs
6	<100 UFC	<100 UFC	P	P	P	P	P
9	<100 UFC	<100 UFC	P	Abs	Abs	Abs	abs
12	<100 UFC	<100 UFC	Abs	Abs	Abs	P	P
19	<100 UFC	<100 UFC	Abs	P	P	Abs	Abs
25	<100 UFC	<100 UFC	P	Abs	Abs	P	P

Les résultats de la contamination volontaire se sont révélés positifs ; pour chaque souche recherchée sur son milieu spécifique ; on a observé une croissance d'aspect macroscopique identique à celles des résultats du test de fertilité. On prend comme exemple le lot N°6 contaminé avec : *S. aureus*, *P.aeruginosa*, *S.typhi*, *E. coli* et *C.albicans*.

L'aspect de la pousse bactérienne : un trouble pour les milieux liquides TSB, Rappaport , MacConkey broth .Une pousse bactérienne ; colonies blanches de *Candida* sur Saboraud, colonies jaune de *staphylococcus* sur TSA, colonies transparentes à vertes de *Pseudomonas* sur Cétrimide , colonies Roses d'*E.coli* sur Mc agar et des colonies noirs de *Salmonelle* sur XLD

Tableau 14 : résultats de l'analyse complète d'un lot (Lot 6)

<ul style="list-style-type: none"> • Enrichissement sur TSB 	Observation
	<p>On observe une forte diminution du volume avec un trouble.</p>
<p>Résultats du milieu TSB contaminé</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • Recherche des <i>Staphylococcus aureus</i> 	
	<p>On observe des colonies jaunes et un virage de couleur du milieu vers la même couleur.</p>
<p>Résultats de la croissance de <i>S.aureus</i> sur Mannitol.</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • Recherche des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 	
	<p>On observe des colonies transparentes à vertes (production de pyoverdine).</p>
<p>Résultats de la croissance de <i>P.aeruginosa</i> sur Cétrimide.</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • Recherche de <i>Candida albicans</i> 	
	<p>On observe des colonies transparentes à blanches.</p>
<p>Résultats de la croissance de <i>C.albicans</i> sur Saboraud.</p>	

Résultats et discussion

<ul style="list-style-type: none"> • Recherche des <i>Salmonella typhi</i> 	
	<p>On observe un virage au vert pour le milieu d'enrichissement Rappaport.</p>
<p>Résultats de la croissance de <i>S.typhi</i> sur Rappaport.</p>	
	<p>On observe une croissance de colonies rouges à centre noir sur le milieu XLD.</p>
<p>Résultats de la croissance de <i>S.typhi</i> sur XLD.</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • Recherche d'<i>Escherichia coli</i> 	
	<p>On observe pour le milieu d'enrichissement d'<i>E.coli</i> un virage de couleur vers le jaune.</p>
<p>Résultats de la croissance d'<i>E.coli</i> sur Macconkey broth.</p>	
	<p>On observe sur le milieu Macconkey agar des colonies beiges à roses.</p>
<p>Résultats de la croissance d'<i>E.coli</i> sur Macconkey agar.</p>	

Conclusion

Dans cette étude, une analyse de la qualité microbiologique des différentes formes et composants de quelques médicaments non obligatoirement stériles disponibles à HUP PHARMA a été réalisée dans le but de prouver leur conformité.

Il a été conclu que les résultats de l'analyse de nos produits révélant une croissance des germes pathogènes (*S. aureus*, *P.aeruginosa*, *E. coli*, *S. typhimurium* et *C.albicans*) étaient dus à l'introduction de ces derniers durant l'analyse de quelques lots. Leur absence pour l'analyse avec et sans l'utilisation d'un bec bunsen ; sauf *Salmonella typhimurium* pour les lots 14, 17 et 22 où nous avons identifié la source de cette contamination. Cette croissance est similaire aux résultats de l'identification des souches de références et de leur utilisation pour prouver la fertilité des milieux de culture utilisés.

Ces mêmes résultats révèlent la présence non significative des germes aérobies viables totaux, des levures et moisissures dans toutes les conditions d'analyse.

L'obtention de ces résultats conformes aux normes permet de s'assurer de la qualité des produits analysés ; confirmant les bonnes pratiques de fabrication, de conditionnement et de transport, en approuvant la maîtrise de la méthode du contrôle au niveau du laboratoire par application des directives de la dernière version de la pharmacopée européenne (9^{ème} édition).

Bien que ce travail nous ait permis d'acquérir une expérience dans le domaine du contrôle de la qualité des médicaments et que ces résultats soient assez significatifs. Cependant nous ne pourrions pas prétendre qu'ils soient déterminants.

Et afin de compléter cette étude, il est souhaitable d'effectuer une analyse physico-chimique déterminant les paramètres suivants : taux de friabilité, acidité/alcalinité, dissolution, dessiccation, etc. Ainsi qu'un suivi de l'analyse de l'eau et de la bio-contamination en se référant aux méthodologies décrites dans l'annexe 4.

Résumé

Le contrôle qualité du médicament est une activité essentielle et indispensable pour les industries pharmaceutiques. Il apporte une expertise technique et scientifique indépendante sur la qualité des médicaments produits et leur sécurité d'emploi.

L'objectif de notre travail est de vérifier la conformité des différentes formes de médicaments non obligatoirement stériles et de leurs composants (matières premières, excipients, produits en cours de fabrication et produits finis) disponibles à HUP PHARMA Constantine, sur lesquels nous avons effectué un contrôle microbiologique précédé par la mise en culture des souches de référence ainsi que leur identification afin de tester la fertilité des milieux de cultures usuels et sélectifs employés pour l'analyse.

Cette analyse effectuée dans des conditions d'asepsie en premier temps, révèle l'absence de germes pathogènes et la présence non significative de FTAM, levures et moisissures. Dans un deuxième temps, l'analyse réalisée sans bec bunsen montre des résultats conformes témoignant de la bonne maîtrise de la bio-contamination. En dernier, une contamination volontaire par des souches pathogènes donne une croissance microbienne avec des aspects identiques à ceux validés préalablement pour chaque milieu.

La conformité des produits analysés se traduisant par une charge microbienne très faible, voire nulle témoigne de la maîtrise de l'environnement et des procédés de production par l'application des bonnes pratiques de fabrication (BPF), des bonnes pratiques de laboratoire (BPL) et du respect des exigences microbiologiques spécifiées par les Pharmacopées.

Mots-clés : contrôle qualité – produits pharmaceutiques – souches de référence-milieux de culture-microbiologie pharmaceutique.

Abstract

Quality control of the drug is an essential and indispensable activity for the pharmaceutical industry. It provides independent technical and scientific expertise on the quality of the drugs produced and their safety of use.

The purpose of our work is to check the conformity of the various forms of non-compulsorily sterile drugs and their components (raw materials, excipients, in-process products and finished ones) available at HUP PHARMA Constantine, on which we carried out a microbiological check preceded by the cultivation of the reference strains and their identification in order to test the fertility of the usual and selective media used for the analysis.

This analysis was carried out under aseptic conditions at first, which revealed the absence of pathogenic germs and the non-significant presence of FTAM, yeasts and molds. In a second step, the analysis carried out without Bunsen burner shows compliant results indicating the good control of the bio-contamination. Finally, a voluntary contamination by pathogenic strains revealed a microbial growth with aspects identical to those previously validated for each medium.

The conformity of the products analyzed resulting in a very low microbial appearance, or none indicates the good control of the environment and production processes through the application of good manufacturing practices (GMP), good laboratory practices (GLP) and compliance with the microbiological requirements specified by the Pharmacopoeia.

Keywords: Quality control - pharmaceuticals - reference strains - culture medium - pharmaceutical microbiology

ملخص

إن مراقبة نوعية الأدوية عملية أساسية وضرورية في صناعتها، إذ تقدم خبرة تقنية وعلمية مستقلة بشأن نوعية المنتج وسلامة استهلاكه. والهدف من هذه المذكرة هو التحقق من جودة مختلف أشكال الأدوية الغير معقمة ومكوناتها (المواد الخام، السواغات، المنتجات قيد المعالجة والمنتجات النهائية) المنتجة لدى HUP PHARMA.

قبل البدء في تحليل الأدوية، وجب علينا التأكد من قابلية الكائنات الدقيقة المرجعية على النمو في الأوساط الأساسية والانتقائية كدليل على قابلية استعمال هذه الأوساط.

نتائج التحاليل الميكروبيولوجي التي تمت في الظروف العادية من التعقيم كشفت عن عدم وجود البكتريا المسببة للأمراض، الخمائر وكذا الفطريات. التحاليل في غياب التعقيم وبدون استعمال موقد بنزن أظهرت نتائج ملائمة. وأما التلويث الإرادي بالميكروبات فقد أظهر نموا ملحوظا وفق السلالة المستخدمة ما يثبت جودة الأدوية.

إن مطابقة المواد التيتم تحليلها تبين وجود شحنة ميكروبية ضعيفة إلى منعدمة ما يدل على التحكم في وسط وظروف العمل من خلال تطبيق ممارسات التصنيع الجيدة الممارسات المعملية الجيدة و كذا احترام المتطلبات الميكروبيولوجية المذكورة في دستور الأدوية.

الكلمات المفتاحية: مراقبة الجودة - المواد الصيدلانية- السلالات المرجعية - وسائط استنبات- ميكروبيولوجيا الدواء.

*Les références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

A .Helal.(1989). Pharmacologie fondamentale et clinique à l'usage ,2ème édition, Alger.

ALAIS C, et LINDEN G. (1997). Abrégé de biochimie alimentaire. Edition Masson, Paris. P.248.

Aveline L., Cartier O., Cuer P., Daucé P., March C., Désévéday E., Dovillez P., Duchet N. et autres. (2000). Gériatrie. ESTEM (éditions scientifiques, techniques et médicales). p359.

AlbertL., CœurA., L'espagnol C., Lesieur D., (1974). Chimie des médicaments. Tome 1.1èreédition. Maloine. Paris. pp : 234-324-403.

Anonyme. (1997). Pharmacie, Documentation juridique 2ème Edition, Alger, pp : 258.

Alexandre P. (2014). El kouri, la qualité et ses outils applicatif, Université de Nantes, Faculté de Pharmacie.

Avril J.L., Denis F., Dabernat H., Monteil H. (2000). *Bacteriologie clinique*.2ème édition Marketing, paris. Pages 148-280.

AVRIL JL, MONTEIL H, DOBERNAT H, DENIS F. (2006). Bacteriologie clinique. Edition ELLIPSE

AK Gautam, R Bhadauria. (2012).Characterization of *Aspergillus* speciensassociatedwithcommerciallystoredtryphalopower, Vol 11; N104.

AFNOR (2008) NF U47-102, Animal health analysis methods — Isolation and identification of any *Salmonella* serotype or of specified *Salmonella* serotypes among mammals. France

B

Baronas Ph. (2006). Guide de l'Ultra propreté, 400 activités analysées, référence détaillées, 1000 entreprises contacts clés (France- Belgique –Suisse), 5^e Edition, France, pp : 16.

Baldent, (1997). Coloration usuelles en bactériologie. Revue de développement et santé .Février (1997).

Benaissa A.(2011). « Etude de la dégradation photocatalytique d'un colorant synthétique et d'un tensioactif ».Thèse doctorat ,UniversitéMentouri Constantine, Algérie.

Références Bibliographiques

<https://bu.umc.edu.dz/theses/ch-ind/KAC6061.pdf>

Lambert, Roxane.(2013). Thèse pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. s.l: Université de Lorraine - Faculté de Pharmacie, 11 février.

http://pharma.univ-lorraine.fr/sites/default/files/livret-pharma_12-13.pdf

Berman, J., & Sudbery, P. E. (2002). Candida albicans: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. Nature Reviews Genetics, 3(12), 918-932.

Pharmacopée européenne 4.7. Contrôle microbiologique des produits non stériles. Recherche de microorganismes spécifiés. Solution et milieux de culture recommandés. Milieu gélosé H : 2.6.13. 4600.

C

CHAMPE C.P., HARVEY A.R et MYCEK J.M.(2000). Pharmacology, Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia. 2ème édition, P 04- 16.

CHAPMAN, G.H. (1945).The significance of sodium chloride in studies of staphylococci, J. Bact..50 : 201-203

C. Lilet ; J Bourdon ; B Toma ; N Marchal et C. Balbastre (1983) ; Bactériologie médicale et vétérinaire- systématique bactérienne ; Edition DOIN. PP 150-190.

CRISTINA T. (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat, Université de Bucarest, France

D

Dessaigne A. (2004) . Maitrisez la fiche posologique d'un médicament. Editions heures de France., p71.

Dr François Resplandy.,(2015)/www.Doctissimo.fr/

E

Références Bibliographiques

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

Economique, OECD Organisation de Coopération et de Développement. Les Principes de l'OCDE de Bonnes pratiques de laboratoire (tels que révisés en 1997). (1998). Publication de l'OCDE sur l'Hygiène et la Sécurité d l'Environnement .SERIE SUR les Principes DE bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes Numéro 1. Paris : s.n,

El Kour, D. P. (2003). Infections à staphylocoques : aspects cliniques et bactériologiques. *EMC, maladies infectieuses*, [8-007-A-10].

F

Fontenneau J.M. et Klusiewicz P. (2008). Cahiers du préparateur en pharmacie, Travaux pratiques de préparation et de conditionnement des médicaments. Edition Wolters Kluwer, France., p264.

Fauchere J.L. and Avril J.L. (2002). Bactériologie générale et médicale. ellipses, Paris. 213-217.

FLAUDROIS JP. (2004). Bactériologie/croissance bactérienne. Cours de Bactériologie

G

Garnier M.- Delamare V. – Delamare J. Delamare Th.- Delamare F.- Delamare L. et Malville E. (1995). Dictionnaire des termes de médecine, 24^{ème} Edition, Paris Edition Maloine, pp : 264-485.

Guillaume. P.Y. (2004). Les milieux de culture en microbiologie.

Gellen-Dautremer J. (2007). Bactériémie à *Pseudomonas aeruginosa* en médecine intern : revue rétrospective de 51 épisodes. Thèse de doctorat en médecine Paris

H

Haouzi R. (2013). Etude biologique des effets des microondes sur *Escherichia coli*. Mémoire. Université des sciences et de la technologie d'Oron Mohamed Boudiaf. 60 P.

Références Bibliographiques

Haley, L.D., J. Trandel, and M.B. Coyle.(1980). Cumitech II, Practical methods for culture and identification of fungi in the clinical microbiology laboratory.Coordinating ed., J.C. Sherris.American Society for Microbiology, Washington, D.C.

J

J.M.Ajache,S.Ajache et R. Renoux .(2000).Initiation à la connaissance du médicament p17, 18.Masson 4^{ème} édition.

Janeway, C. A., Jr., The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. ImmunolToday 1992. 13: 11-16.

K

Korsak N., Clinquart A., Daube G. (2004). *Salmonella spp.* dans les denrées alimentaires d'origine animale: un réel problème de santé publique ? Les annales de médecine vétérinaire 148(4): 174-193.

L

LANDRY, Yves. (2012) Initiation à la connaissance du médicament –UE6 pages.2^{ième} édition.Dunod. Paris : pp. 41-48.

Le Hir. (2001). Pharmacie galénique, bonne pratique de fabrication des médicaments, 7^{ème} Edition, Masson, Paris, pp : 120-269.

LE MINOR- C. RICHARD. (1993).Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries, Institut pasteur, Paris: 1217 pages.

Lowbury,E.J.L., and collins ,A.G.(1955). The use of a new cetrimide product in a selective medium for *Pseudomonas aeruginosa*.,J. Clin. Pathol., 8 : 47.

M

Moulin M., Coquerel A. (2002) .pharmacologie : Connaissance et pratique ,2^{ème} édition Masson.845 page.

Références Bibliographiques

Marcel G. A., Garnier M., (1987). Le médicament de l'an 2000. Edition Masson. Paris.pp :5-33.

Meyer et Denier. (1996). « spectroscopie pratique dans le domaine du visible et de l'ultraviolet », Bull. Un. Phys. 784. P (895 – 908),.

McCONKEY, A. and HILL, C.A. (1901). Bile salt broth. Thompson-Yates Laboratories Report VI/1 .

Mansouri S, Houbraken J, Samson RA, Frisvad JC, Christensen M, Tuthill DE, Koutaniemi S, Hatakka A, Lankinen P.(2013). *Penicilliumsubrubescens*, a new species efficiently producing inulinase.Antonie Van Leeuwenhoek 103:1343-1357.

Mäkelä MR, Mansouri S, Wiebenga A, Rytioja J, de Vries RP, Hildén K. (2016) .*Penicilliumsubrubescens* is a promising alternative for *Aspergillus niger* as a producer of plant biomass degrading enzymes. New Biotechnol, 33: 834-841.

O

Olivier ALLO, Pascale BLANC, Marie Ange DALMASSO.(2013). Pharmacie GaléniqueB.P ,2ème édition, 132p.

O.M.S(1998) : Assurance de la qualité des produits pharmaceutiques : recueil de directives et autre documents. (1).287 pages.

Organisation mondiale de la santé (OMS). (2000).Guide pour l'élaboration de mesures visant à éliminer les médicaments contrefaits. Genève ; (Document non publié WHO/EDM/QSM/99.1)

P

Pharmacopée européenne.(2004)-5 ème Edition. - Version électronique (CD-ROM)

Pharmacopée européenne. (2014). 8ème Edition, Version électronique (CD-ROM).

P. Wehrlé. (2007). Assurance qualité et bonnes pratiques de fabrication. In : Pharmacie galénique, formulation et technologie pharmaceutique. Maloine, p : 1-26.

Pharmacopée américaine. (2007). (USP30-NF25)-Version électronique (CD-ROM).

Peterz, M., C. Wiberg, and P. Norberg. (1989).**The effect of incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth of salmonella in home-made and**

Références Bibliographiques

commerciallyavailable dehydrated Rappaport-Vassiliadis broths. J. Appl. Bacteriol. 66:523-528.

Rappaport,F.KONFORTI , N., and NAVON , B.(1956).A new enrichment medium for fer certain *Salmonellae*. **Journal of Clinical Pathology, 9 : 261-266.**

R

Ratajczak, M.et al.,(2014) .Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products. Saudi Pharmaceutical Journal.

Ramdani S., Soltana F.(2003). « Détermination simultanée de l'aluminium et du fer par spectrophotométrie dérivée à l'aide de la méthode Zero- Crossing ».Mémoire ingénieur, Université A. M Bejaia,.

S

Scriban., (1999). Biotechnologie. 5^{ème} édition. Tec&Doc. Paris. pp : 920-927.

Schorderet M., (1989). Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Genève.pp : 20-537.

Sudbery, P., Gow, N. et Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol 12:317-324.

Schmidt, A., and M. H. Wolff.(1997). Morphological characteristics of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from patient samples.Mycoses 40:347-51.

T

Taylor, W.I. (1965). Isolation of shigellae. I. Xylose lysine agars; new media for isolation of enteric pathogens. Am. J. Clin. Pathol., 44:471-475.

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 .

Références Bibliographiques

Y

Yahiaoui N.(2012). Mémoire de magister « Etude de l'adsorption des composés phénoliques des margines d'olive sur carbonate de calcium, hydroxyapatite et charbon actif », Université Mouloud Mammerim Tizi Ouzou,

Yves, LE LOIR, and GANTIER Michel. (2009). Staphylococcus aureus. Lavoisier.

Sites internet :

-<http://infocollections.org/medregpack/documents/d0168/d0168.pdf>

■[https://bivi.afnor.org/notice-details/les-bonnes-pratiques-de-laboratoire-mode d'emploi](https://bivi.afnor.org/notice-details/les-bonnes-pratiques-de-laboratoire-mode-d-emploi).

--<https://www.appvizer.fr/magazine/operations/gestion-de-projet/5-m> .

-<https://www.mediray.co.nz/>

-<http://www.huppharma.com/>

-<http://www.microbiologie-medicale.fr/mycologie/identificationchampignons>.

Annexes

Annexe 01 : Les milieux de cultures

→ Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja (TSA) :

C'est un milieu utilisé pour la recherche des bactéries aéro-anaérobie peu exigeante, sa composition est la suivante :

Hydrolysats pancréatique de la caséine....	15g
Peptone papainique de soja.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar bactériologique.....	15g

→ Milieu gélosé Sabouraud Dextrose Agar

C'est un milieu classique pour la recherche et l'identification des levures et moisissures saprophyte ou pathogène, sa composition est la suivante :

Dextrose	40g
Peptone de viande et de caséine.....	10g
Agar bactériologique.....	15g

→ Milieu XLD Agar :

C'est un milieu de culture sélectif adapté à l'isolement de Salmonella typhi, sa composition est la suivante :

Extrait de levure.....	3g
Chlorure de sodium.....	5g
Xylose	3.75g
Lactose	7.5g
Saccharose	7.5g
L-lysine	5g
Thiosulfate de sodium.....	6.8g
Citrate d'ammonium.....	0.8g
Phénol rouge.....	0.08g
Desoxycholate de sodiu.....	1g
Agar	15g

→ Milieu liquide aux peptones de caséine et de soja (TSB) :

C'est un milieu nutritive sous forme de bouillon, il favorise la culture d'une très grande variété de microorganismes, sa composition est la suivante :

Hydrolysats pancréatique de la caséine	17g
Chlorure de sodium.....	5g
Peptone papainique de soja.....	3g
Glucose monohydraté.....	2.5g
Phosphate dipotassique.....	2.5g

→ Milieu Cetrimide

La gélose au cetrimide est un milieu sélectif destinée pour l'isolement et le dénombrement de *pseudomonasaeruginosa*, sa composition est la suivante :

Hydrolysats pancréatique de la gélatine....	20g
Sulfate de potassium.....	10g
Chlorure de magnésium.....	1.4g
Cetrimide	0.3g
Agar bactériologique	13.6g

→ Milieu Mannitol Salt agar :

C'est un milieu sélectif pour l'isolement et la numération des staphylocoques. Il permet également de différencier les espèces fermentant le mannitol de celles qui ne le fermentent pas, sa composition est la suivante :

Chlorure de sodium	75g
Agar.....	15g
Protéase peptone.....	10g
D-Mannitol.....	10g
Peptone.....	1g
Phénol rouge.....	0.025g

→ **Milieu Mac Conkey Agar :**

La gélose de Mac Conkey est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement des Entérobactéries tel qu'*Escherichia coli*, sa composition est la suivante :

Hydrolysats pancréatique de Gélatine.....	17g
Lactose monohydrate.....	10g
Chlorure de Sodium.....	5g
Peptone de viande et de caséine.....	3g
Sels biliaire.....	1.5g
Rouge neutre.....	0.03g
Cristal violet.....	0.001g
Agar bactériologique.....	13.5g

→ **Milieu Rappaport :**

C'est un bouillon d'enrichissement sélectif pour l'isolement de *Salmonella typhi*, sa composition est la suivante :

Chlorure de magnésium.....	13.4g
Chlorure de sodium.....	7.2g
Peptone de soja.....	4.5g
Phosphate monopotassique.....	1.26g
Phosphate dipotassique.....	0.18g
Vert de malachite.....	0.036g

→ **Milieu gélosé PCA (plate count agar) :**

C'est une gélose glucosée à l'extrait de levure en industries pharmaceutique il est utilisée pour l'analyse des produits et de leur matière première et pour le contrôle de la biocontamination de l'air, sa composition est la suivante :

Tryptone	5g
Extrait autolytique de levure	2.5g
Glucose	1g
Agar bactériologique	12

→ **Milieu Mac ConkeyBroth :**

C'est un bouillon d'enrichissement sélectif pour l'isolement d'*Escherichia coli*, sa composition est la suivante :

Hydrolysats pancréatique de gélatine.....	20g
Lactose monohydraté.....	10g
Bille de bœuf déshydratée.....	5g
Pourpre de bromocrésol.....	0.01g

→ **L'eau peptonée :**

C'est un milieu liquide d'usage général, on l'utilise pour la réalisation des différentes dilutions et l'analyse du produit, sa composition est la suivante :

Phosphate de potassium déshydraté	3.6g
Phosphate de disodium hydrogéné déshydraté.....	7.2g
Chlorure de sodium.....	4.3g
Peptone	1g

→ **Milieu gélosé R2A :**

Elle est, utilisée en industrie pharmaceutique pour le contrôle de biocontamination de l'eau purifiée et l'eau EPPI, sa composition est la suivante :

Protéase peptone	0.5g
Extrait de levure	0.5g
Hydrolysats acide de caséine	0.5g
Glucose	0.5g
Amidon soluble	0.5g
Pyruvate de sodium	0.5g
Phosphate de potassium dibasique	0.3g

Annexe 02 : Les substrats déshydratés des différentes galeries utilisées.

Galerie API 20 E :

Micro tube	Substrat	Caractère recherchée (enzyme/réaction)	Résultats	
			négatif	Positif
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Incolore	Jaune
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Omithine	- Arginine dihydrolase - Lysine décarboxylase - Ornithine décarboxylase	-Jaune -Jaune -Jaune	-Rouge/Orangé -Orangé -Rouge/Orangé
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Vert pale/jaune	Bleu-vert/bleu
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	Jaune	Rouge orangé
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	JAMES / immédiat	
			Incolore Vert pale-jaune	Rose
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétone	VP1 + VP 2 / 10 minutes	
			Incolore	Rose -rouge
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Bleu/bleu-vert	Jaune

Galerie API 20 NE :

Microtube	Substrat	Caractère recherchée (enzyme/réaction)	Résultats	
			Négatif	Positif
NO3	Potassium nitrate	Réduction des nitrates en nitrites	NIT1+NIT2 / 5 minutes	
			incolore	Rose-rouge
		Réduction des nitrates en azote	ZN / 5 minutes	
			Incolore Vert pâle/jaune	Rose
TRP	L-tryptophane	Formation d'indole (Tryptophane)	JAMES /5 minutes	
			Incolore Vert pâle /jaune	Rose
GLU	D-glucose	Fermentation (glucose)	Bleu à vert	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine Di Hydrolase	Jaune	Orange /rouge
URE	urée	Urease	Jaune	Orange /rouge
ESC	esculine citrate de fer	Hydrolyse (β -glucosidase) (Esculine)	Jaune	Gris /marron /noir
GEL	gélatine (origine bovine)	hydrolyse (protéase) (Gélatine)	Pas de diffusion de pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl- β Dgalactopyranoside	E-galactosidase (Para-Nitrophényl- β DGalactopyranosidase)	Incolore	Jaune
GLU	D-glucose	assimilation (Glucose)	Transparente	Trouble
ARA	L-arabinose	assimilation (Arabinose)		
MNE	D-mannose	assimilation (Mannose)		
MAN	D-mannitol	assimilation (Mannitol)		
NAG	N-acétyl-glucosamine	assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)		
MAL	D-maltose	assimilation (Maltose)		
GNT	potassium gluconate	assimilation (potassium Gluconate)		
CAP	acide caprique	assimilation (acide Caprique)		
ADI	acide adipique	assimilation (acide Adipique)		
MLT	acide malique	assimilation (Malate)		
CIT	trisodium citrate	assimilation (trisodium Citrate)		
PAC	acide phénylacétique	assimilation (acide Phénylacétique)		

Galerie API STAPH :

Microtube	Substrat	Caractère recherchée (enzyme/réaction)	Résultats	
			Négatif	Positif
GLU	D-Glucose	Acidification à partir du carbohydrate	Rouge	Jaune
FRU	D-Fructose			
MNE	D-Mannose			
MAL	Maltose			
LAC	Lactose			
TRE	D-Tréhalose			
MAN	D-Mannitol			
XLT	Xylitol			
MEL	D-Mélioïdose			
NIT	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrite	NIT1+NIT2/5 minutes	
			Rose	Rouge
PAL	β -naphtyle ac phosphate	Phosphatase alcaline	ZYMA +ZYM B/10 minutes	
			Jaune	Violet
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbinol	VP1+VP2/10 minutes	
			Rose	Violet-rose
RAF	D-Raffinose	Acidification à partir du carbohydrate	Rouge	Jaune
XYL	Xylose			
SAC	Saccharose			
MDG	α -méthyl-D-glucoside			
NAG	N-acétyl-glucosamine			
ADH	Arginine		Arginine dihydrolase	Jaune
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge - violet

Galerie API CANDIDA :

<i>Microtube</i>	<i>Substrat</i>	<i>Caractère recherchée</i> <i>(enzyme/réaction)</i>	<i>Résultats</i>	
			<i>Négatif</i>	<i>Positif</i>
GLU	D-glucose	Acidification (glucose)	Violet Gris-violet	jaune vert /gris
GAL	D-galactose	Acidification (galactose)		
SAC	D-saccharose	Acidification (saccharose)		
TRE	D-trehalose	Acidification (tréhalose)		
RAF	D-raffinose	Acidification (raffinose)		
βMAL	4-nitrophényl-βD-maltopyranoside	β-maltosidase	Transparent	Jaune /jaune pale
αAMY	2-chloro-4-nitrophényl-αD maltotrioside	α-amylase	Transparent	Jaune / jaune pale
βEXYL	4-nitrophényl-βD-xylopyranoside	β-xylosidase	Incolore-jaune pale / bleu-vert	Jaune /jaune pale
βGUR	4-nitrophényl-βD-glucuronide	β-glucuronidase	Transparent /bleu /vert	Jaune / jaune pale
URE	Urea	Urease	Jaune /orange pale	Rouge
βNAG 1	5-bromo-4-chloro3-indoxyl-N-acetyl-βD-glucosaminide	N-Acetyl-β-Glucosaminidase	Transparent /jaune	Bleu /vert
βNAG 2	5-bromo-4-chloro3-indolyl-βD-galactopyranoside	β-galactosidase	Transparent /jaune	Bleu /vert

Api 20 E :



Figure 1 : La galerie API 20E avant inoculation.



Figure 2 : La galerie API 20E après inoculation et avant incubation.

Api 20 NE :



Figure 3 : La galerie API 20NE avant inoculation.



Figure 4 : La galerie API 20 NE après inoculation

Api STAPH :

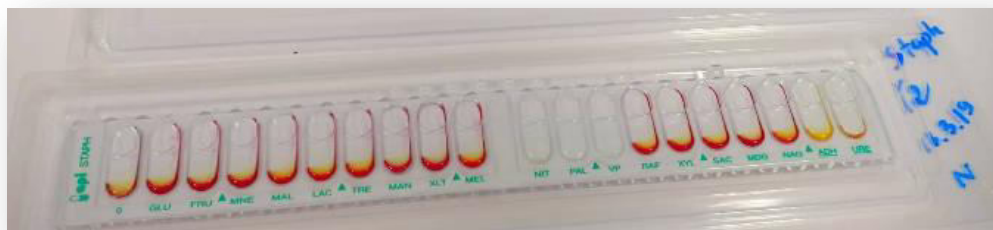


Figure 5 : La galerie API STAPH avant inoculation.



Figure 6 : La galerie API STAPH après inoculation.

API CANDIDA :



Figure 7 : La galerie API CANDIDA avant inoculation.



Figure 8 : La galerie API CANDIDA après inoculation

API 50 CHE :

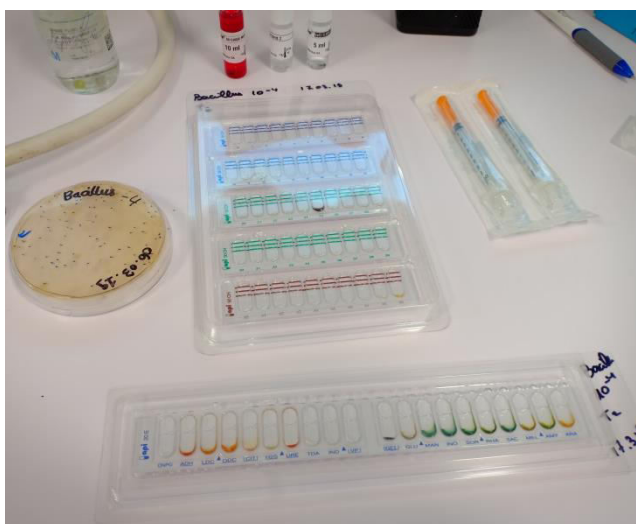


Figure 9 : La galerie API 50 CHE avant inoculation

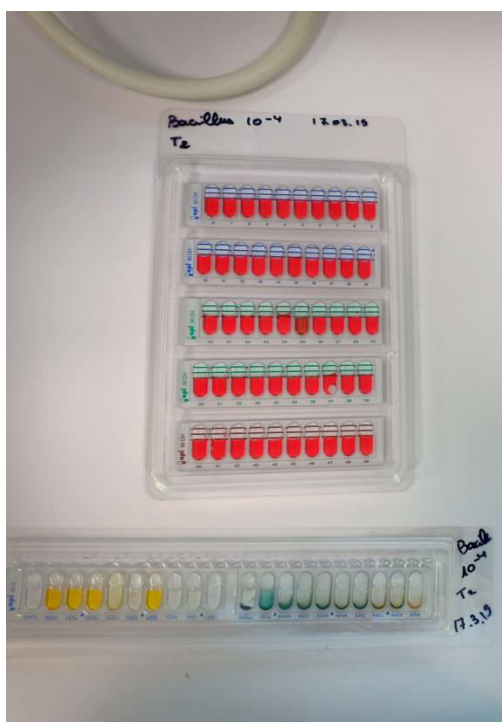


Figure 10 : La galerie API 50 CHE après inoculation

Annexe 03 : Stérilisation du Matériel, des Milieux de culture et tri des déchets

1-La stérilisation du matériel et milieux de culture :

La stérilisation est réalisée d'une façon quotidienne avant et après chaque manipulation et analyse sur les différents matériels et milieux utilisés, deux sortes de stérilisation sont réalisées :

✚ Une stérilisation sèche :

Utilisée pour la stérilisation des petits matériels après vérifications de sa propreté et l'absence de toute trace d'humidité tels que les flacons ; les pipettes graduées et l'équipement de filtration dans l'étuve dans une température de 180 C° pendant 30 minutes.

→ Avant chaque stérilisation, le matériel est enveloppé avec du papier aluminium comme suit :



Figure1: Erlenmeyer

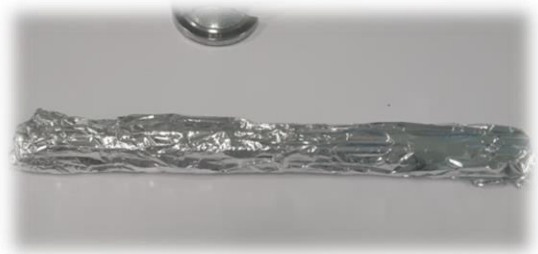


Figure 2: pipettes graduées



Figure3: La rampe de filtration

✚ Une stérilisation humide :

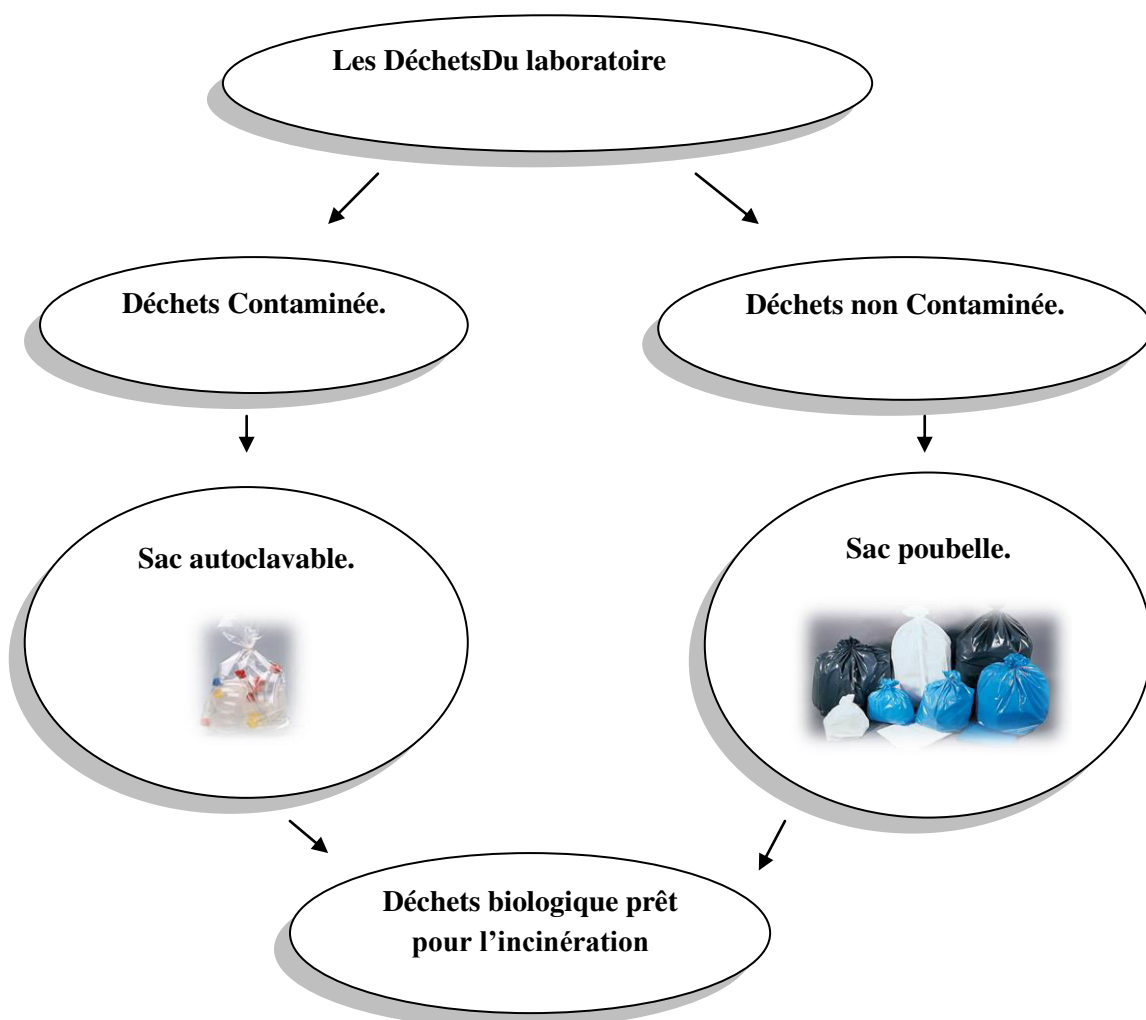
Utilisée pour la stérilisation des milieux de culture une fois préparés selon le mode opératoire approprié et repartis dans des flacons et la destruction des milieux contaminés contenus dans des flacons



Figure 4: Le milieu TSB repartis dans des flacons prêt pour la stérilisation

→ Après chaque stérilisation ; le matériel est rangé dans le tiroir du matériel stérile et les flacons contenant les milieux sont placés dans le passbox.

2-Tri des déchets du laboratoire :



Annexe 04 : Contrôle de la Bio contamination de l'environnement et de l'eau

1-Contrôle de la bio contamination de l'air :

Cette procédure s'applique pour le contrôle de la biocontamination au service de microbiologie et les unités de productions au laboratoire de **HUPP Pharma**, afin de surveiller et de maintenir les zones de travail en excellente condition, deux techniques sont utilisées : la technique de sédimentation, l'échantillonneur volumétrique d'air.

- **Technique de sédimentation :**

Les boîtes de pétrie contenant le milieu PCA sont préalablement préparées (voir annexe), l'analyste transporte et place ces boîtes sur les surfaces des salles a contrôler , les boîtes sont laissées ouvertes pendant 4 heures de temps , puis ramassées avec précaution et incubées pendant 3 jours a une température de 32.5C° , cette méthode est utilisée chaque jour pour les zones indiquées dans le tableau (voir tableau) .

Tableau 1: Les points de prélèvement par la technique de sédimentation.

	Classe
-Salle fabrication stérile	B
-Salle remplissage aseptique	
-Distributeur	
-SAS vestiaire	C
-Distributeur	
-Salle fabrication non stérile	D
-SAS pesée non stérile	
-Salle lavage et dépyrogénéation des ampoules	
-SAS vestiaire hommes et femmes	

- **l'échantillonneur volumétrique d'air (Sampl'air lite) :**

Fabriqué par BioMérieux S.A, le SAMPL' AIR LITE est un préleveur d'air , pour mesure de l'aéro-biocontamination par impaction et culture sur gélose en boîte de pétrie, utilisé seulement au niveau du laboratoire d'analyse microbiologique une fois par semaine.



Figure 1: L'appareil SAMPL'AIR LITE de Biomerieux .

✓ **Principe :**

La collecte des germes dans l'air est réalisée par aspiration d'air, à travers une tête de prélèvement déposée quelque mm au-dessus d'une boîte de pétrie, les microorganismes sont collectés grâce à une grille en acier inoxydable monobloc.

L'analyste suit les étapes d'utilisation de l'échantillonneur d'air SAMPL AIR comme décrite dans l'instruction de l'appareil :

- Les boîtes de pétrie sont placées sur la tête de prélèvement de l'échantillonneur d'air tout en respectant son asepsie ;
- Le prélèvement est effectué depuis les zones les plus stériles vers les zones les moins stériles ;
- Stériliser préalablement la partie supérieure de l'appareil
- Placement du préleveur d'air au milieu de la salle à contrôler ;
- Le prélèvement de l'air se fait selon la durée décrite dans le tableau ;
- La boîte est retirée de la tête du préleveur avec précaution afin de n'apporter aucune contamination et incubé pendant 3 jours à une température de 32.5 C°.
- l'appareil est désinfecté à l'aide d'une solution d'alcool isopropylique 70% d'un lieu de prélèvement à un autre, puis stérilisé dans l'étuve à la fin .

Tableau 2: Les points de prélèvement par la méthode de l'échantillonneur SAMPL'AIR LITE.

	<i>Classe</i>
<i>-Salle d'essai de stérilité</i>	<i>B</i>
<i>-Salle déchargement</i>	<i>B</i>
<i>-SAS classe B</i>	<i>B</i>
<i>-SAS Classe C</i>	<i>C</i>
<i>-Salle de manipulation et d'incubation</i>	<i>C</i>
<i>-SAS classe C</i>	<i>C</i>
<i>-Salle préparation milieux de culture et stérilisation</i>	<i>D</i>
<i>-Salle de rédaction et de réception</i>	<i>D</i>
<i>-Laverie</i>	<i>D</i>
<i>-Couloir</i>	<i>D</i>
<i>-Vestiaire</i>	

2-Contrôle du matériel et main d'œuvre :

Le contrôle des surfaces permet de contrôler l'efficacité du nettoyage et de la désinfection, ou de dépister des « nids » microbiens, l'écouvillonnage est utilisé pour le contrôle des zones à accès difficile. (Voir tableau 3).

- **Écouvillonnage :**

L'écouvillon stérile est préalablement humidifié dans de l'eau peptonée tamponnée additionnée à une solution neutralisante tween 80.

- L'écouvillon est passé sur les zones à contrôler définies en stries parallèle rapprochées en le faisant tourner légèrement puis toujours sur la même zone en stries perpendiculaires aux premiers.

- L'écouvillon est agité puisensemencé directement sur le milieu gélosé PCA .

- Les boîtes sont incubées à 32C° pendant 3 jours.

Tableau 3: Les points de prélèvement pour la méthode d'écouvillonnage.

	<i>Classe</i>
<i>-Tuyauterie de vapeur</i>	<i>B</i>
<i>-Tuyauterie de drainage</i>	
<i>-Tuyauterie condensat de vapeur</i>	
<i>-Recoins d'armoires (inférieurs et supérieurs)</i>	
<i>-Poignées de porte</i>	
<i>-Réglage des flemmes</i>	
<i>-Réglage du N2</i>	
<i>-Les Opérateurs</i>	

➤ **Lecture et interprétation :**

La lecture des différentes boîtes et écouvillons des zones à contrôler est réalisée sous PSM, l'interprétation se fait en fonction de la classe des zones contrôlées.

1- Contrôle par sédimentation et écouvillonnage :

<i>Classe</i>	<i>Contamination microbologique recommandée en activité en UFC/m3</i>
<i>A</i>	<01
<i>B</i>	05
<i>C</i>	50
<i>D</i>	100

2-L'échantillonneur volumétrique d'air (SAMPL'AIR LITE) :

- Comptage :

$$X=N/V$$

n : nombre d'UFC retrouvée sur la boîte

N : nombre d'UFC correspondant à n sur la table (voir figure)

V : durée du prélèvement en mn*0.1m³

V= 10mn

- Méthodologie :
 - Compter les colonies sur les boîtes ;
 - Lire le N sur le tableau (voir figure) ;
 - Calculer le V : $10 \times 0.1 = 1 \text{ m}^3$;
 - Calculer le X UFC/m³ ;

TABLEAU DE CORRESPONDANCE n - N									
CORRESPONDENCE TABLE n - N									
n	N	n	N	n	N	n	N	n	N
1	1	53	59	106	137	159	247	212	445
2	2	54	61	107	138	160	250	213	451
3	3	55	62	108	140	161	252	214	456
4	4	56	63	109	142	162	255	215	462
5	5	57	64	110	143	163	258	216	468
6	6	58	66	111	145	164	260	217	475
7	7	59	67	112	147	165	263	218	481
8	8	60	68	113	149	166	266	219	487
9	9	61	70	114	150	167	269	220	494
10	10	62	71	115	152	168	272	221	501
11	11	63	72	116	154	169	275	222	508
12	12	64	74	117	156	170	278	223	515
13	13	65	75	118	158	171	280	224	523
14	14	66	76	119	160	172	283	225	531
15	15	67	78	120	161	173	286	226	539
16	17	68	79	121	163	174	290	227	547
17	18	69	80	122	165	175	293	228	555
18	19	70	82	123	167	176	296	229	564
19	20	71	83	124	169	177	299	230	573
20	21	72	84	125	171	178	302	231	582
21	22	73	86	126	173	179	305	232	592
22	23	74	87	127	175	180	309	233	602
23	24	75	89	128	177	181	312	234	613
24	25	76	90	129	179	182	315	235	624
25	26	77	91	130	181	183	319	236	635
26	27	78	93	131	183	184	322	237	647
27	29	79	94	132	185	185	326	238	660
28	30	80	96	133	187	186	329	239	673
29	31	81	97	134	189	187	333	240	687
30	32	82	99	135	191	188	337	241	702
31	33	83	100	136	193	189	340	242	717
32	34	84	102	137	195	190	344	243	734
33	35	85	103	138	197	191	348	244	752
34	36	86	105	139	200	192	352	245	771
35	38	87	106	140	202	193	356	246	792
36	39	88	108	141	204	194	360	247	814
37	40	89	109	142	206	195	364	248	839
38	41	90	111	143	208	196	368	249	866
39	42	91	112	144	211	197	372	250	897
40	43	92	114	145	213	198	376	251	931
41	45	93	115	146	215	199	381	252	971
42	46	94	117	147	218	200	385	253	1018
43	47	95	118	148	220	201	390	254	1076
44	48	96	120	149	222	202	394	255	1152
45	49	97	122	150	225	203	399	256	1259
46	51	98	123	151	227	204	404		
47	52	99	125	152	229	205	408		
48	53	100	127	153	232	206	413		
49	54	101	128	154	234	207	418		
50	56	102	130	155	237	208	423		
51	57	103	131	156	239	209	429		
52	58	104	133	157	242	210	434		
		105	135	158	245	211	439		

Figure 2 : Tableau de correspondance n-N.

<i>Classe</i>	<i>Contamination microbiologique Recommandée en activité en UFC/m³</i>
<i>A</i>	<01
<i>B</i>	10
<i>C</i>	100
<i>D</i>	200

3-Contrôle de la biocontamination de l'eau :

Cette procédure est réalisée selon les normes qualitatives et les méthodes de contrôle des eaux à usage pharmaceutique qui sont bien définies sur la pharmacopée européenne 9^{ème} édition qui classe les types d'eau comme suivant :

- L'eau purifiée (EP) .
- L'eau pour préparation injectable (EPPI).

3-1-L'eau purifiée :

La plus utilisée en industrie pharmaceutique, destinée à la préparation des médicaments stériles et non stériles et de leur contrôle qualité.

3-2-l'eau pour préparations injectable :

Divisée en 2 types, eau pour préparation des injectables en vrac et l'eau stérilisée destinée à être répartie dans des récipients appropriés.

✓ *Prélèvement :*

- Vaporiser le robinet avec de l'alcool 70.
- Ouvrir le robinet.
- Laisser couler pendant 2 secondes.
- Remplir un tube de 10 ml pour l'analyse de l'eau purifiée et un flacon de 500 ml pour l'EPPI plus un petit flacon pour l'analyse des endotoxine

Tableau 4: Les points de prélèvement d'eau.

<i>Salle de fabrication stérile</i>
<i>Salle de fabrication non stérile</i>
<i>Salle de lavage des ampoules</i>
<i>Salle de remplissage aseptique</i>
<i>Enrobeuse</i>
<i>Granulateur</i>
<i>Pelliculage</i>
<i>Réacteur non stérile</i>
<i>Autoclave</i>
<i>Laveries</i>
<i>Sortie de la cuve de stockage</i>

→ **Filtration sur membrane :**

Sous PSM on réalise une « filtration sur membrane », à l'aide d'une rampe de filtration (voir figure) à travers une membrane filtrante stérile, on installe la rampe et on retire à l'aide d'une pince stérilisé avec de l'alcool l'emballage externe du filtre délicatement puis le placer sur la rampe. la quantité d'eau prélevée est versée avant l'ouverture du robinet de la rampe, l'eau est filtrée grâce a une pompe sous vide, le filtre est récupéré avec la pince encore stérilisé et déposé sur milieu R2A (voir figure), on incube a une température de 35.5C° pendant 5 jours .

**Figure 3:** Rampe de filtration à trois postes avec entonnoir de 100 ml.

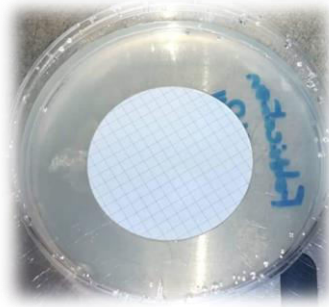


Figure 4 : Membrane de filtration déposée sur milieu R2A.

→ **Lecture :**

Après incubation on fait une lecture et on effectue un dénombrement des germes viables totaux sur gélose R2A.

Norme

Eau a usage pharmaceutique

$\leq 100\text{UFC/ml}$

Annexe 05 : résultats des profils numériques d'identification des souches de référence

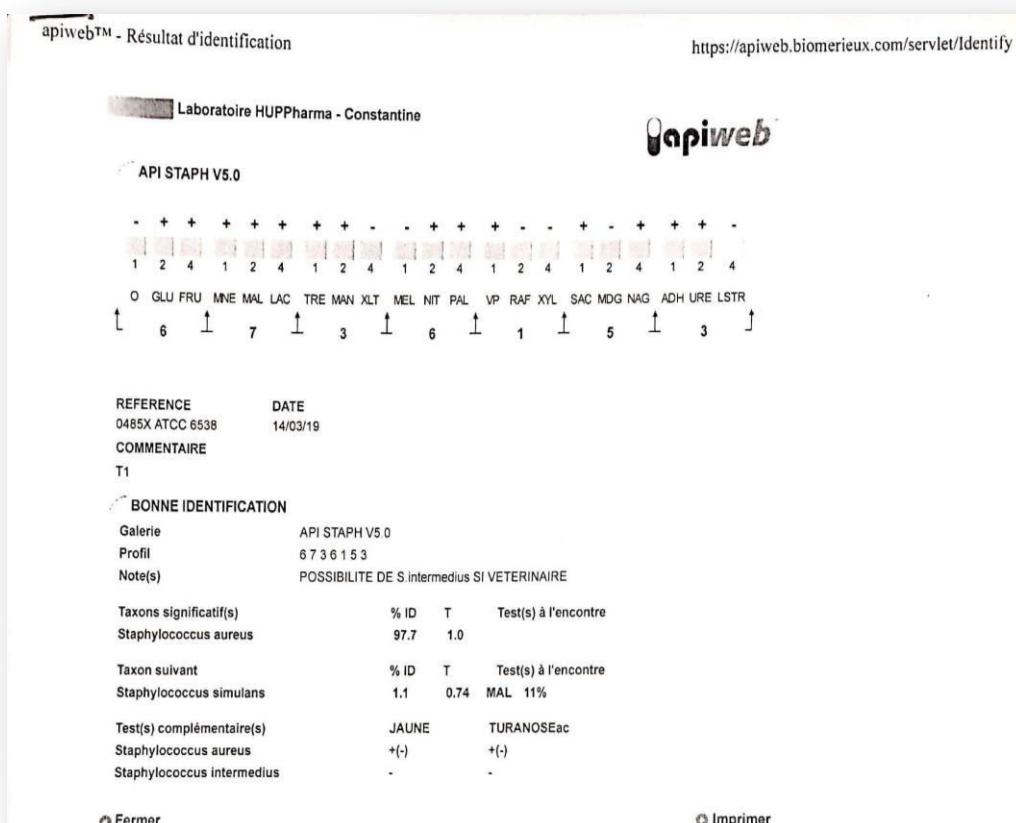


Figure 1: Resultat du profil numérique de la souche Staphylococcus aureus sur API web

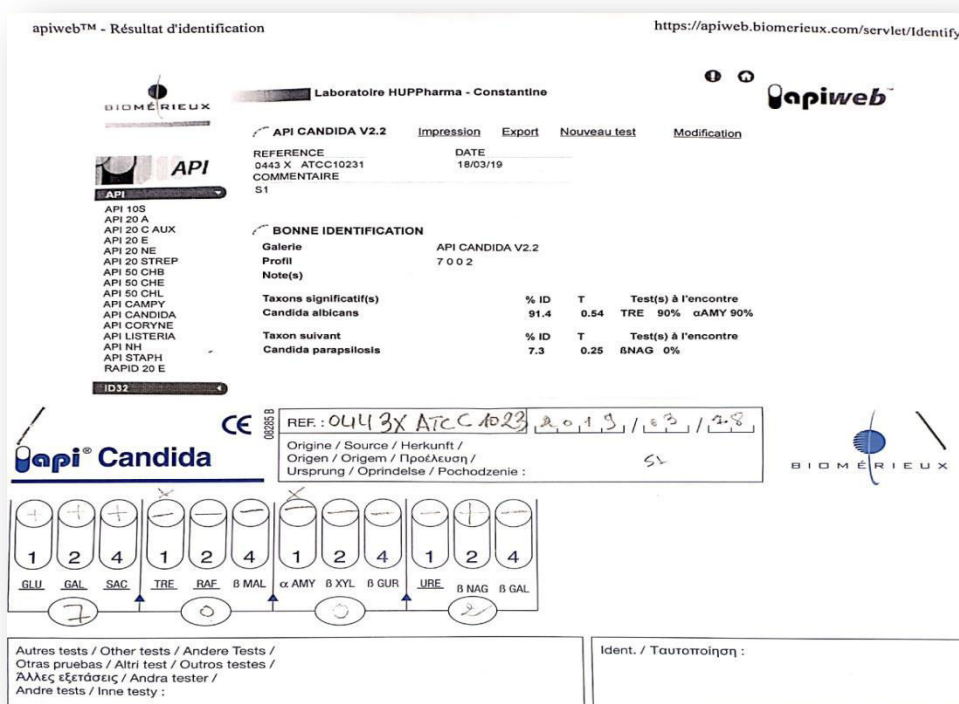


Figure 2 : Résultat du profil numérique de la souche Candida albicans sur API Web .

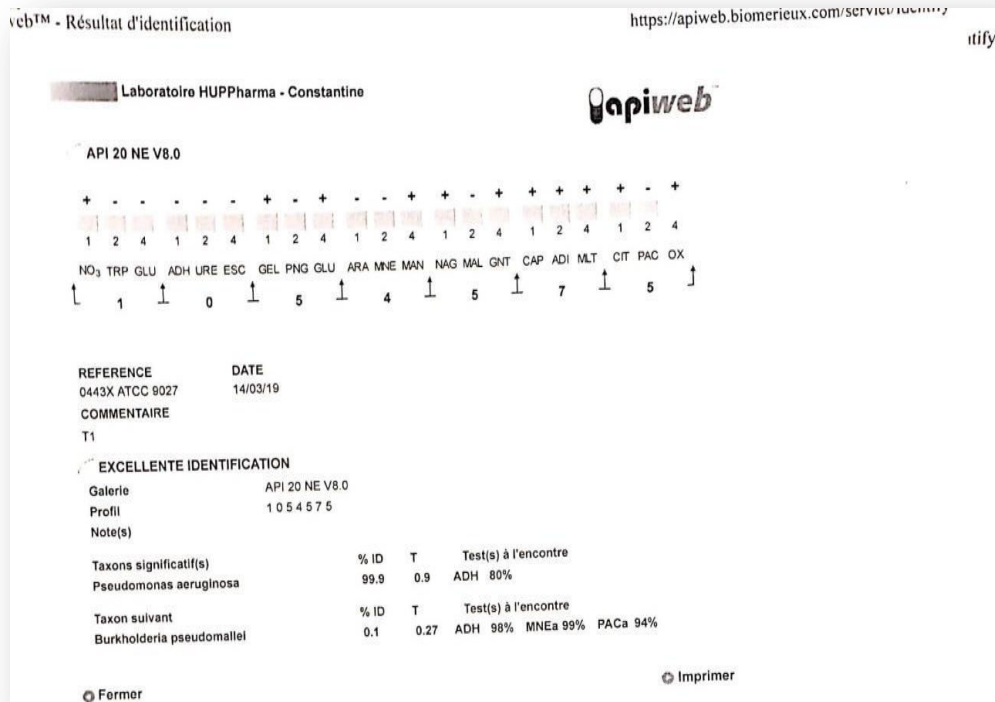


Figure 3: Resultat du profil numérique de la souche *Pseudomonas aeruginosa* sur API web

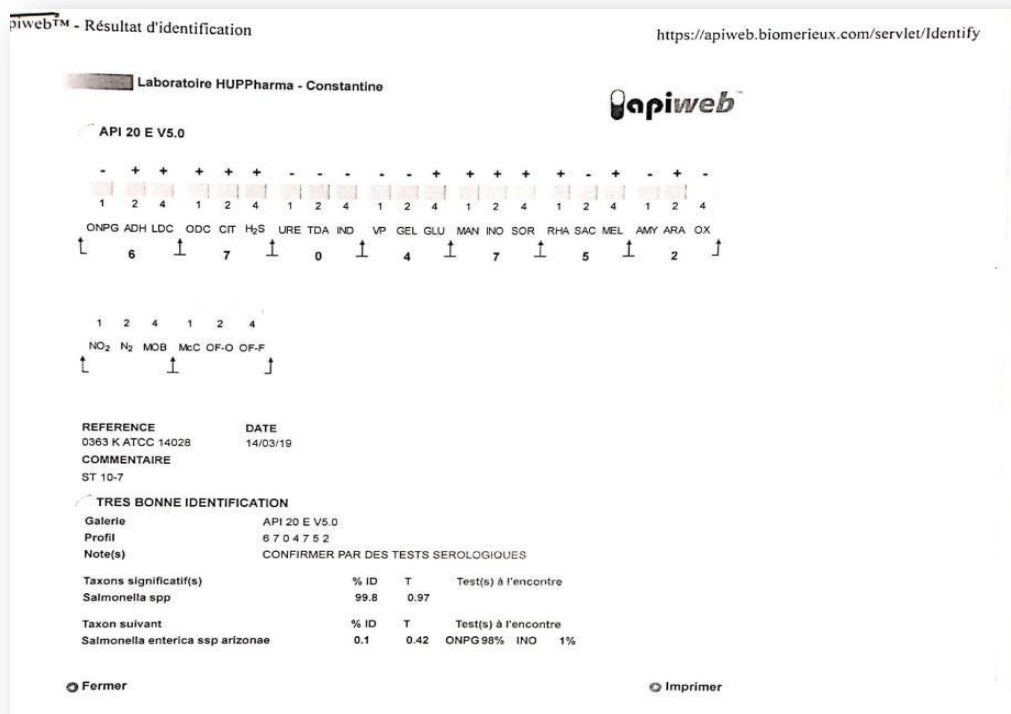


Figure 4 : Résultat du profil numérique de la souche *Salmonella typhie* sur API Web

<p align="center">Noms et Prénoms :</p> <p align="center">HAMADA Nessrine et SOUDANI Yassamine</p>	<p align="center">Date de soutenance : 23-07-2019</p>
<p align="center"><i>Thème : Analyses microbiologiques des produits pharmaceutiques non obligatoirement stériles à HUP PHARMA</i></p>	
<p>Résumé :</p> <p>Le contrôle qualité du médicament est une activité essentielle et indispensable pour les industries pharmaceutiques. Il apporte une expertise technique et scientifique indépendante sur la qualité des médicaments produits et leur sécurité d'emploi.</p> <p>L'objectif de notre travail est de vérifier la conformité des différentes formes de médicaments non obligatoirement stériles et de leurs composants (matières premières, excipients, produits en cours de fabrication et produits finis) disponibles à HUP PHARMA Constantine, sur lesquels nous avons effectué un contrôle microbiologique précédé par la mise en culture des souches de référence ainsi que leur identification afin de tester la fertilité des milieux de cultures usuels et sélectifs employés pour l'analyse. Cette analyse effectuée dans des conditions d'asepsie en premier temps, révèle l'absence de germes pathogènes et la présence non significative de FTAM, levures et moisissures. Dans un deuxième temps, l'analyse réalisée sans bec bunsen montre des résultats conformes témoignant de la bonne maîtrise de la bio-contamination. En dernier, une contamination volontaire par des souches pathogènes donne une croissance microbienne avec des aspects identiques à ceux validés préalablement pour chaque milieu La conformité des produits analysés se traduisant par une charge microbienne très faible, voir nulle témoigne de la maîtrise de l'environnement et des procédés de production par l'application des bonnes pratiques de fabrication (BPF), des bonnes pratiques de laboratoire (BPL) et du respect des exigences microbiologiques spécifiées par les Pharmacopées.</p>	
<p>Mots-clés : contrôle qualité – produits pharmaceutiques – souches de référence - milieux de culture - microbiologie pharmaceutique.</p>	
<p align="center">Laboratoire de stage : laboratoire d'analyses microbiologique au sein d'HUP PHARMA Constantine.</p>	
<p>Président de jury : Mr KACEM CHAOUICHE N. Prof. UFM. Constantine 1. Rapporteur : M^{me} HARZALLAH B. MCB. UFM. Constantine 1. Examinatrice : M^{me} YOUCE ALI M. MCB. UFM. Constantine 1. Maître de stage : M^{me} OUNISSI C. Responsable du laboratoire Microbiologique à HUP PHARMA.</p>	