



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement Supérieur

et de la recherche scientifique

Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen

Faculté des Technologies

Département de chimie

**Mémoire de fin d'études pour l'obtention de diplôme Master
en Génie pharmaceutique**

Thème

*La qualité
microbiologique des
médicaments*

Présentée par : Mlle BENATTIA Farah Kenza

Soutenu devant la commission du jury composée de :

- ❖ **Président : Mr KAJIMA Joseph.....Professeur**
- ❖ **Examineur : Mr BENDIABDALLAH Djamel.....MAA**
- ❖ **Examinatrice : Mme BEDJAOUI Lamia.....Professeur**
- ❖ **Encadreur : Mr ARRAR Zoheir.....MCA**
- ❖ **Encadreur : Mr CHIKH Djawad.....Docteur**

Année universitaire 2011-2012

Dédicace

*Je dédie ce travail à mes parents, qu'ils
trouvent ici toute ma gratitude pour leur
soutien tout au long de mes études, sans eux ce
travail n'aurait jamais vu le jour*

A mes sœurs et mes frères

A mes nièces : Rania, Sofia,

Djihane, Tesnime

A tous mes collègues et amies

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier mon chef de département et mon encadreur Mr : (ARRAR Zoheir), son précieux conseil et son aide durant toute la période de nos études.

Je tiens à remercier également Monsieur :

(CHIKH Djawad), l'encadreur industriel pour ses bonnes explications qu'ils ont éclairé le chemin de la recherche.

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

Président Mr : KAJIMA Joseph

Examineurs Mr : BENDIABDALLAH Djamel et

Mme : BEDJAOUI Lamia

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Sommaire

Introduction générale.....	P01
Présentation de la société.....	P02
Partie théorique	

Chapitre (I) : Généralités

I.1. Définition du médicament.....	P07
A. Principe actif	P07
B. Les excipients.....	P07
I.2. Préparation du médicament.....	P07
I.3. Etapes de développement d'un médicament.....	P08
I.4. L'industrie pharmaceutique.....	P10
I.5. Contrôle qualité des médicaments.....	P10
I.5.1. Qualité des matières premières.....	P10
I.5.2. Les récipients.....	P11
I.5.3. Etudes de stabilité.....	P11

Chapitre (II) : la qualité microbiologique requise des différentes préparations pharmaceutiques

Introduction

II.1 Méthode de la pharmacopée européenne.....	P12
● Catégorie 1.....	P12
- Les Formes pharmaceutiques destinées à la voie parentérale....	P12
✓ Préparations injectables.....	P12
✓ Préparations pour perfusions I.V.....	P12
✓ Poudres pour injection ou perfusion I.V.....	P13
✓ Les Implants.....	P13
- Qualité des préparations injectables.....	P13
a) Qualités obligatoires.....	P13
✓ Stérilité.....	P13
✓ Absence de pyrogène.....	P13
b) Qualités facultatives.....	P15
✓ Isotonie.....	P15
- Les Formes pharmaceutiques destinées à la voie oculaire.....	P15
✓ Collyres.....	P15
✓ Les solutions pour lavage oculaire.....	P16
● Catégorie 2.....	P16
- Les Formes pharmaceutiques destinées à la voie respiratoire.....	P17

✓	Liquides pour nébulisation.....	P17
✓	Inhalateurs pressurisés à valve doseuse.....	P17
✓	Inhalateurs à poudre sèche.....	P17
●	Catégorie 3.....	P17
-	Les Formes pharmaceutiques destinées à la voie rectale.....	P18
✓	Les suppositoires.....	P18
✓	Suspensions et solutions à usage rectales.....	P18
-	Les Formes pharmaceutiques destinées à la voie orale.....	P18
✓	Les formes solides.....	P18
✓	Poudres orales.....	P18
-	Les Formes obtenues par répartition des poudres dans des enveloppes.....	P19
a)	Les sachets.....	P19
b)	Les gélules ou capsules dures.....	P19
-	Les Formes obtenues par traitement des poudres.....	P19
a)	Comprimés.....	P19
b)	Granulés.....	P20
c)	Capsules molles.....	P20
-	Les formes liquides.....	P21
a)	Formes multidoses.....	P21
b)	Sirops.....	P21
c)	Liquides pour admission orale.....	P21
-	Les Formes unitaires.....	P21
a)	Ampoules buvables.....	P21
●	Catégorie 4.....	P21
●	II.2 La qualité microbiologique des substances pour usage pharmaceutique non stérile.....	P22

Chapitre (III) : les paramètres à maîtriser afin d'assurer et conserver la qualité microbiologique des médicaments

Introduction

III. 1.	La stérilisation	P25
III.1.1.	Les différents modes de la stérilisation	P25
III.1.1.1.	Stérilisation par la chaleur.....	P25
III.1.1.1.1.	Sensibilité des micro-organismes à la chaleur	P25
III.1.1.1.2.	Procédés de stérilisation par la chaleur.....	P28
A.	Chaleur sèche	P29
B.	Chaleur humide	P29

III.1.1.2. Stérilisation par filtration.....	P32
III.1.1.2.1. Filtres stérilisants.....	P32
III.1.1.2.2. Conduite de la filtration stérilisatrice.....	P33
III.1.1.3. Stérilisation par les rayonnements.....	P33
III.1.1.3.1. Les rayons Ultraviolet.....	P33
III.1.1.3.2. Les ionisants : les rayonnements Beta (β) et Gamma (γ).....	P35
III.1.1.4. Stérilisation par les gaz.....	P35
III.1.1.4. 1. Le formaldéhyde.....	P35
III.1.1.4. 2. L'acide peracétique.....	P35
III.1.1.4. 3. L'oxyde d'éthylène§.....	P35
III.2. Enceintes stériles et conditionnement aseptique.....	P36
III.2.1. Définition de l'asepsie et comment la garantir.....	P36
III.2.2. Le travail en asepsie.....	P36
III.2.2.1. Travail sous flux laminaire vertical.....	P36
III.2.3. Enceintes stériles.....	P37
III.2.3.1. Atmosphère des enceintes stériles.....	P37
III.2.3.2. Contrôle des enceintes stériles.....	P38
III.3. Définition les bonnes pratiques de fabrication (BPF).....	P39
III.3.1. Importances des B.P.F.....	P39
III.3.2. Bonnes pratiques de fabrication et laboratoire de contrôle.....	P39
III.3.3. La gestion de la qualité.....	P40
III.3.3.1. Définition.....	P40
III.3.3.2. Principe.....	P40
III.3.3.3. Aspect contrôle de qualité.....	P40
III.3.3.4. Mise en œuvre de la gestion de la qualité.....	P41
III.3.4. Assurance qualité.....	P41
III.3.4.1. Objectifs d'assurance qualité.....	P41
✓ Qualité sécurité et santé publique.....	P41
✓ Qualité et économie.....	P42
III.3.4.2. Définition de l'ISO 8402.....	P42
III.3.4.3. principes de mise en œuvre.....	P42
III.3.5. Personnel.....	P43
III.3.5.1. Les postes clés.....	P43
III.3.5.2. Formation du personnel.....	P43
III.3.5.3. Hygiène du personnel.....	P44
III.3.6. Moyens matériels nécessaires aux opérations de fabrication.....	P44
III.3.6.1. Locaux.....	P45
III.3.6.2. Équipements nécessaires à la préparation de médicaments stériles.....	P45
A. Zone d'atmosphère contrôlée ZAC.....	P45
✓ schéma aéraulique.....	P46
✓ Sas d'accès.....	P49
✓ Alimentation et évacuation des eaux.....	P49

B. Dispositifs séparatifs	P49
✓ Les isolateurs.....	P49
III.3.7. Documentation	P50
III.3.8. La production	P51
III.3.9. Le contrôle de la qualité	P51
III.3.10. Fabrication et analyse sous-traitance	P51
III.3.11. Auto-inspection	P52
III.4. Efficacité de la conservation antimicrobienne	P52
III.4.1. Essai de l'efficacité de la conservation antimicrobienne	P52
III.4.2. Procédé	P53
III.4.3. Critères d'acceptation	P54

Chapitre (IV) : Contrôle qualité

Introduction

IV.1. Contrôles biologiques de routine appliqués aux médicaments injectables et aux dispositifs médicaux stériles et apyrogènes	P55
IV.1.1. Contrôle de la stérilité des dispositifs médicaux	P55
IV.1.2. Contrôle de la stérilité des préparations pharmaceutiques	P56
IV.1.2.1. Intérêt relatif de l'essai de stérilité	P57
IV.1.2.2. Limites de l'essai de stérilité	P57
IV.1.2.3. Matériel nécessaire	P57
✓ Appareillage sont nécessaires.....	P57
✓ Réactifs et milieux de culture sont nécessaires.....	P58
IV.1.2.4. Échantillonnage	P58
IV.1.2.5. Méthodologies	P59
✓ Filtration sur membrane.....	P59
✓ Ensemencement direct.....	P60
✓ Essai de stérilité proprement dit.....	P60
✓ Tests de validation.....	P60
IV.1.2.6. Interprétation des résultats	P61
IV.2. L'apyrogénicité	P63
IV.2. 1. Définition des endotoxines bactériennes	P63
IV.2.2. Localisation des endotoxines	P63
IV.2.3. Structure des endotoxines	P64
IV.2.4. Propriétés biologiques	P65
IV.2.4.2. Propriétés immunologiques	P65
IV.2.4.2.1. La spécificité sérologique	P65
IV.2.5. Essais de détection des endotoxines bactériennes	P66
IV.2.5.1. Les tests de détection	P66
IV.2.5.1.1. Le test in vivo	P66
IV.2.5.1.2. Le test in vitro	P66
✓ Méthode par gélification.....	P69
✓ Méthode turbidimétrique.....	P69
✓ Méthodes chromogéniques.....	P70

IV.2.6. Critères de la validation	P70
IV.2.6.1. La limite de détection	P70
IV.2.6.2. Spécificité	P71
IV.2.6.3. Répétabilité	P71
IV.2.6.4. Reproductibilité	P71
IV.3. Propreté	P72
IV.3.1. Techniques classiques de la pharmacopée européenne	P72
IV.3.1.1. Méthodes quantitatives	P72
IV.3.1.1.1. Échantillonnage et préparation de l'échantillon	P73
✓ Produits hydrosolubles.....	P73
✓ Produits de nature non lipidique insolubles dans l'eau.....	P73
✓ Produits de nature lipidique.....	P73
✓ Dispositifs médicaux.....	P73
✓ Dispositifs transdermiques.....	P74
IV.3.1.1.2. Examen des échantillons (méthodes utilisées)	P74
✓ Méthode de filtration sur membrane.....	P74
✓ Méthode de dénombrement sur plaque.....	P74
- Par ensemencement en profondeur.....	P74
- Par étalement en surface.....	P75
✓ Méthode du nombre le plus probable.....	P75
IV.3.1.1.4. Interprétation des résultats et limites de contamination	P76
IV.3.1.1.5. Solutions et milieux de culture recommandés	P77
IV.3.1.1.6. Agents neutralisants	P77
IV.3.1.1.7. Recherche de germes spécifiés	P77
IV.3.2. Techniques rapides de contrôle microbiologique	P78
IV.3.2.1. Amélioration d'une technique classique	P78
IV.3.2.2. Techniques alternatives	P78
IV.3.2.3. Applications des principales techniques alternatives dans l'industrie pharmaceutique	P79
IV.3.2.3.1. Appareils utilisés	P79
IV.3.2.3.1.1. Appareils d'impédancemétrie	P79
A. Bactometer.....	P79
B. Rabbit (Rapid Automated Bacterial Impedance Technique).....	P80
IV.3.2.3.1.2. Cytométrie de flux (appareil ChemFlow)	P80
IV.3.2.3.1.3. Cytométrie à balayage laser (appareil Chemscan)	P80
IV.3.2.3.1.4. Bioluminescence	P80
Partie pratique	P81
Conclusion de la partie pratique	P95
Conclusion générale	P96
Références bibliographiques	
Annexes	

LISTE DES ABRÉVIATIONS :

- AMM:** Autorisation de Mise sur le Marché.
- ADN:** Acide Désoxyribonucléique
- ATP :** adénosine triphosphate
- BPF:** Bonnes Pratiques de Fabrication.
- BPP:** Bonnes pratiques de préparation.
- CSE :** Endotoxine Standard de Contrôle.
- DMS :** Dilution Maximale Significative.
- DGAT:** dénombrement des germes aérobies totaux.
- DMLT:** dénombrement des moisissures/levures totaux.
- FDA :** Food and Drug Administration.
- HEPA:** High Efficiency Particulate Air filter.
- ISO:** International Organization for Standardization.
- IM:**intramusculaire
- IV:** intraveineuse.
- LPS :** lipopolysaccharide.
- LAL :** Lysat d'Amoebocytes de limule
- Nacl:** chlorure de sodium.
- NPP :** nombre le plus probable
- NAS:** Niveau d'Assurance de Stérilité
- OMS :** organisation mondiale de la santé.
- Ph. Eur:** Pharmacopée Européenne.
- Ph. Helv:** Pharmacopée Helvétique.
- P.A:** principe actif.
- PNA :** paranitroaniline
- RSE :** Standard Endotoxine de Référence.
- TSA:** Tryptic Soy Agar
- TSB:** Tryptic Soy Broth
- UFC:** unité formant colonie
- UV:** rayon ultra violet
- ZAC:** zone à atmosphère contrôlée

LISTE DES TABLEAUX :

- Tableau 1 :** critères d'acceptation de la qualité microbiologique des substances pour usage pharmaceutique non stériles.....P23
- Tableau 2 :** critères d'acceptation de la qualité microbiologique des formes pharmaceutiques non stériles.....P24
- Tableau 3 :** Nombre de survies en fonction de la durée de chauffage.....P27
- Tableau 4 :** limites recommandées de contamination microbiologique des surfaces suivant les BPF et les BPP.....P46
- Tableau 5 :** Préparations parentérales et ophtalmique.....P54
- Tableau 6 :** Préparations pour application locale.....P54
- Tableau 7 :** Préparations orales.....P54
- Tableau 8 :** Micro-organismes d'essai recommandés par la pharmacopée européenne.....P61
- Tableau 9 :** Valeurs du nombre le plus probable de bactéries....P76

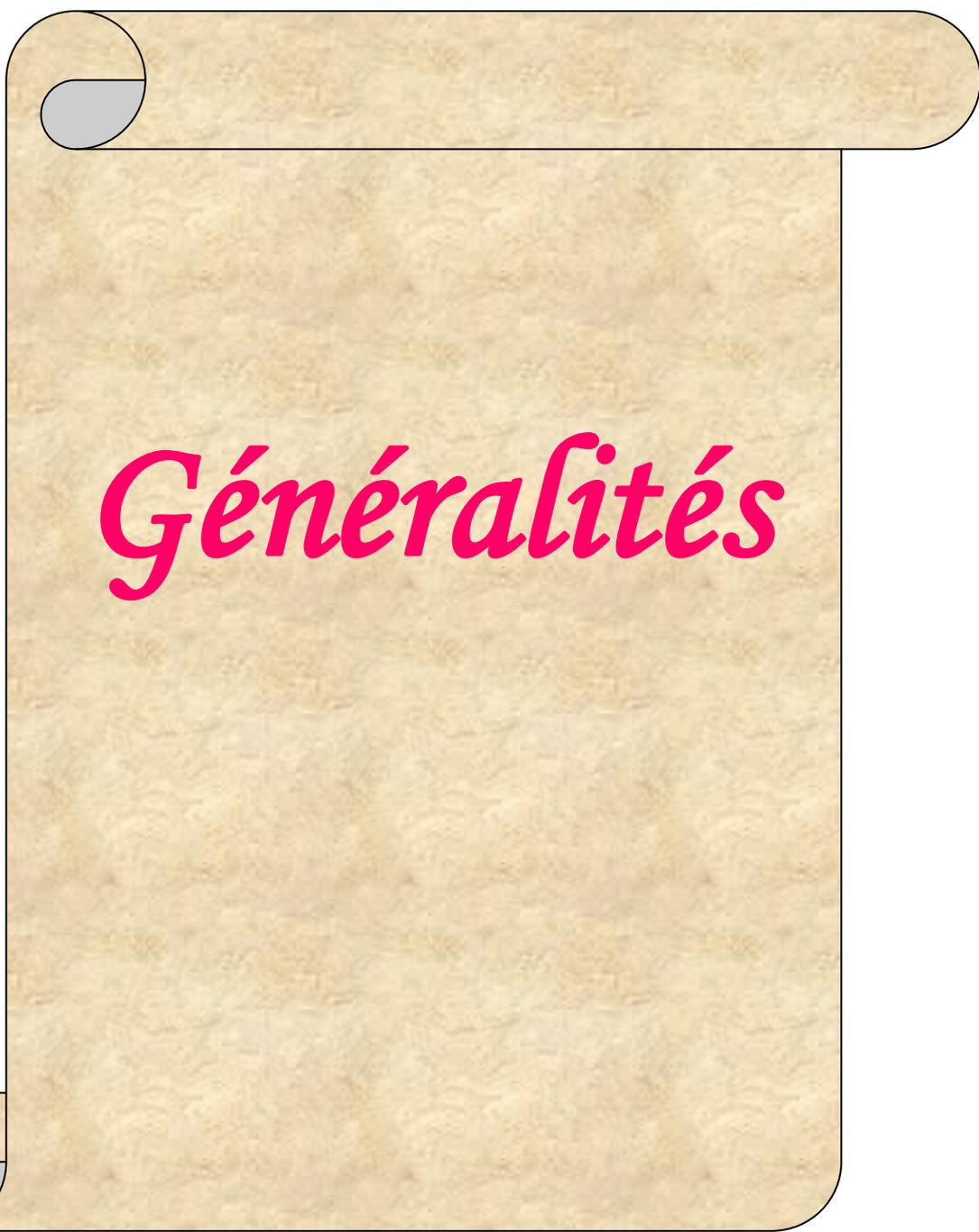
LISTE DES FIGURES:

Figure 1 : Les différentes étapes de développement d'un médicament.....	P09
Figure 2 : Limule.....	P14
Figure 3: Courbe de survie des microorganismes à un traitement thermique de durée « D ».....	P26
Figure 4 : Destruction des spores de Clostridium Botulinum parla chaleur.....	P28
Figure 5: Stérilisateur poupinel.....	P29
Figure 6 : Autoclaves.....	P30
Figure 7 : Stérilisateur à la vapeur sous pression en continu.....	P31
Figure 8 : Types de filtres.....	P32
Figure 9 : Mécanisme de la filtration stérilisante.....	P33
Figure 10 : Stérilisateurs UV.....	P33
Figure 11 : Schéma d'une installation industrielle.....	P34
Figure 12 : Flux laminaire verticale.....	P37
Figure 13 : Schéma d'une enceinte stérile.....	P38
Figure 14 : Gestion de la qualité selon la Pharmacopée Helvétique.....	P40
Figure 15 : Vêtement de protection pour la fabrication aseptique (Classe B).....	P44
Figure 16 : Flux d'air laminaire horizontal.....	P47
Figure 17: Flux d'air laminaire vertical.....	P48
Figure 18: Manipulateur sous flux d'air laminaire vertical.....	P48
Figure 19 : Isolateur stérisafe pour les opérations aseptiques.....	P50
Figure 23 : Appareil d'unité de filtration.....	P58
Figure 24 : Bactérie à Gram négatif.....	P64
Figure 25 : Paroi de bactéries à Gram négatif.....	P65
Figure 26: Morphologie d'une Limule.....	P67

Partie

Théorique

CHAPITRE I



Généralités

Introduction Générale

● La qualité des médicaments est un des majeurs soucis des professionnels des services de santé et des patients, elle se définit par la maîtrise d'ensemble de paramètres et propriétés qui permet d'assurer la sécurité des patients, et amener le médicament à un niveau des exigences satisfaisantes, afin d'atteindre cette qualité il faut évaluer le risque microbiologique lié à la présence de pathogènes dans les médicaments, ceci constitue un grand risque pour les patients et un défi pour les responsables de la sécurité sanitaire.

● La maîtrise de la bio-contamination dans l'industrie pharmaceutique reste une préoccupation constante et s'inscrit dans le contexte général de l'efficacité et de la sécurité des médicaments.

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

● Ce travail a été réalisé dans le cadre du contrôle de la qualité microbiologique des différentes formes pharmaceutiques des médicaments, dont la partie théorique contient quatre chapitres ; Le premier chapitre présente l'industrie pharmaceutique en général ; Le second chapitre est consacré aux différentes catégories des préparations pharmaceutiques.

Les méthodes de stérilisation à mettre en œuvre pour conserver la qualité microbiologique requise des médicaments sont présentées dans le troisième chapitre ; Le dernier chapitre est réservé aux grands principes du contrôle microbiologique à savoir le test de la stérilité et la recherche des substances pyrogènes dans les produits stériles et le test de pureté dans les produits non stériles.

● En outre, nous abordons dans la partie pratique les aspects relatifs au contrôle de la qualité microbiologique de deux formes pharmaceutique à savoir la forme injectable **CEFAZAL® 1g** et la forme gélule **AMPAL® 500 mg**.

● Enfin nous terminons par une conclusion où nous montrons les apports de ce travail ainsi que les résultats obtenus.

Présentation de la société:



La Société Pharmaceutique Algérienne « SOPHAL » crée en **1994**
C'est un laboratoire de produits pharmaceutiques spécialisé dans la production et le développement des médicaments génériques. Elle est située dans le grand pôle industriel de **Hassi Ben Okba** à **15 Km** à l'est d'Oran.

Le type des médicaments « SOPHAL » compte une grande variété de produits, qui non seulement elle constitue des copies conformes des molécules mères, mais aussi elle représente un grand avantage sur le plan économique dans la production pharmaceutique Algérienne.

● *Spécialités*

L'objectif de la société est de développer, fabriquer et commercialiser des médicaments doués d'une efficacité thérapeutique très haute, la gamme pharmaceutique

« SOPHAL » comprend, pour le moment, sept familles de produits, dont les techniques de contrôle ont toutes été validées par le Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (**LNCPP**) :

Les Antibiotiques, les Anti inflammatoires, les cardiovasculaires, la gastrologie, les Antalgiques, les Antidiabétiques et les vitamines.

● *Les Antibiotiques*



Amoxal Injectable 1g



Amoxal Gélules 500mg

● *Les Anti-inflammatoires*



Meprenal Injectable
20mg



Meprenal Injectable
40mg

● *Les cardiovasculaire*



Acetral 200mg



Amlodipal 5mg

● *Les Antalgiques*



Aspigel injectable
900mg



Paracetal 500mg

● *Les vitamines*



Cyanocoba B12



Novital B1/B6

● *Castrologie*



Ranitidine



Gliclazide

● *Structure*

La société « SOPHAL » dispose également d'équipements technologiques de haute performance pour sa production. En ce qui concerne les structures de production,

« SOPHAL » est constituée :

- D'une unité de fabrication des produits pénicilliniques.
- D'une unité de fabrication des produits non pénicilliniques.
- D'une unité de conditionnement des produits stériles injectables.
- D'une aire de stockage des matières premières et produits finis d'une superficie dépassant les 5000 m².
- D'un laboratoire de contrôle de qualité.
- Enfin d'un Laboratoire de recherche et développement.



Photo 1 : Appareil de fabrication des médicaments gélules.

● *Le laboratoire contrôle de qualité*

La société « SOPHAL » a mis en place un laboratoire de contrôle de qualité récent sous la responsabilité d'un pharmacien directeur technique, ce laboratoire a été agréé par le LNCPP en date du **23** Octobre **1996**.

Contient deux départements :

- ✓ *Département Physico-chimie*
- ✓ *Département de Biologie*



Photo 2 : Laboratoire de contrôle de qualité des médicaments.

● *Les supports documentaires*

- Pharmacopées internationales : USP - BP - Pharmacopée Européenne.
- Documentations spécialisés

● *Les équipements*

Des équipements de contrôle très performants ont été acquis afin de répondre aux pharmacopées les plus récentes et les plus exigeantes, entre autres :

- **HPLC** (chromatographie liquide à haute performance).
- **CPG** (chromatographie gazeuse).
- Spectrophotomètre **IR** (infrarouge), Spectrophotomètre **UV** (ultraviolet).
- Unité Stéritest avec hotte à flux laminaire.
- Appareils pour tous les tests de la pharmaco-technique.

● *Engagement*

Vue la diversité des marchés pharmaceutiques entraînant la concurrence, la société « SOPHAL » tient à préserver certaines valeurs fondamentales, à savoir : la créativité, la rigueur et l'éthique. La fiabilité et l'efficacité des médicaments est un engagement primordial de la société « SOPHAL ».

I.1. Définition du médicament :

Un médicament est un produit :

- ❖ préparé et présenté pour guérir ou prévenir les maladies ;
- ❖ ou administré en vue d'établir un diagnostic ;
- ❖ ou administré pour restaurer, corriger ou modifier les fonctions organiques de l'homme ou de l'animal. [4]

A. Principe actif :

Un médicament agit par un ou plusieurs constituants appelés principes actifs. Le principe actif (**P.A.**) est une substance douée de propriétés thérapeutiques, il est le support de l'activité pharmacologique.

Il existe deux catégories de principes actifs :

- Les substances obtenues par synthèse dont les caractéristiques chimiques sont bien définies (ex : acide acétylsalicylique, caféine, digitaline).
- Les substances extraites à partir des produits naturels : végétal, minéral, biologique.

B. Les excipients :

En général, le ou les principes actifs sont associés à un ou plusieurs excipients. Un excipient (du latin excipere : recevoir ; l'excipient reçoit le principe actif) est une substance ou un mélange de substances dites auxiliaires, inactives par elles mêmes sur la maladie, qui facilitent la préparation et l'emploi du médicament. Celui-ci comporte en plus le conditionnement qui en facilite la délivrance, l'utilisation et en assure la conservation. [4]

I.2. Préparation du médicament :

L'association du principe actif et de l'excipient se fait grâce à une mise en forme qui relève du domaine de la pharmacie galénique.

Les opérations de mise en forme font appel généralement à plusieurs étapes :

- formulation,
- fabrication,
- conditionnement. [5]

● Le médicament générique

Le candidat médicament, obtient une autorisation de mise sur le marché

(AMM) pour la production industrielle et la vente exclusive, au moins jusqu'à l'expiration du brevet (**20 ans**).

À ce terme, un laboratoire tiers peut produire une « copie » qui s'appellera « générique » ; Un médicament générique est, par définition, un médicament « exactement » similaire au médicament princeps ou leader dont il n'a pas subi les étapes de recherche mais qui est censé en posséder les indications et, normalement aussi, les qualités de fiabilité, de sécurité et d'efficacité, son prix de revient est moins élevé, ce qui fait son attrait.

Le générique possède :

- la même concentration du même principe actif ;
- la même forme pharmaceutique ;
- la même activité thérapeutique prouvée par des études de biodisponibilité correctement menées. [3]

I.3. Etapes de développement d'un médicament :

La découverte et le développement d'un médicament sont une entreprise longue (**12 à 15 ans** en cas de réussite), difficile (**500 000** molécules sont synthétisées pour un médicament produit) et coûteuse (**600 à 800 millions** d'euros en moyenne). [3]

On peut décrire le processus de développement selon les étapes suivantes :

- Recherche d'une molécule originale candidate au statut de candidat médicament selon plusieurs méthodes :
Modélisation informatique, criblage (screening), observation de médecines traditionnelles, étude des caractéristiques des plantes ou substances naturelles (pharmacognosie), et parfois par les faveurs du hasard lors d'observations cliniques.
- Les molécules candidates sont alors brevetées (brevet = titre de propriété des droits intellectuels permettant l'exploitation commerciale d'un médicament).
- La protection des droits intellectuels est attribuée pour une durée maximale de **20 ans**.

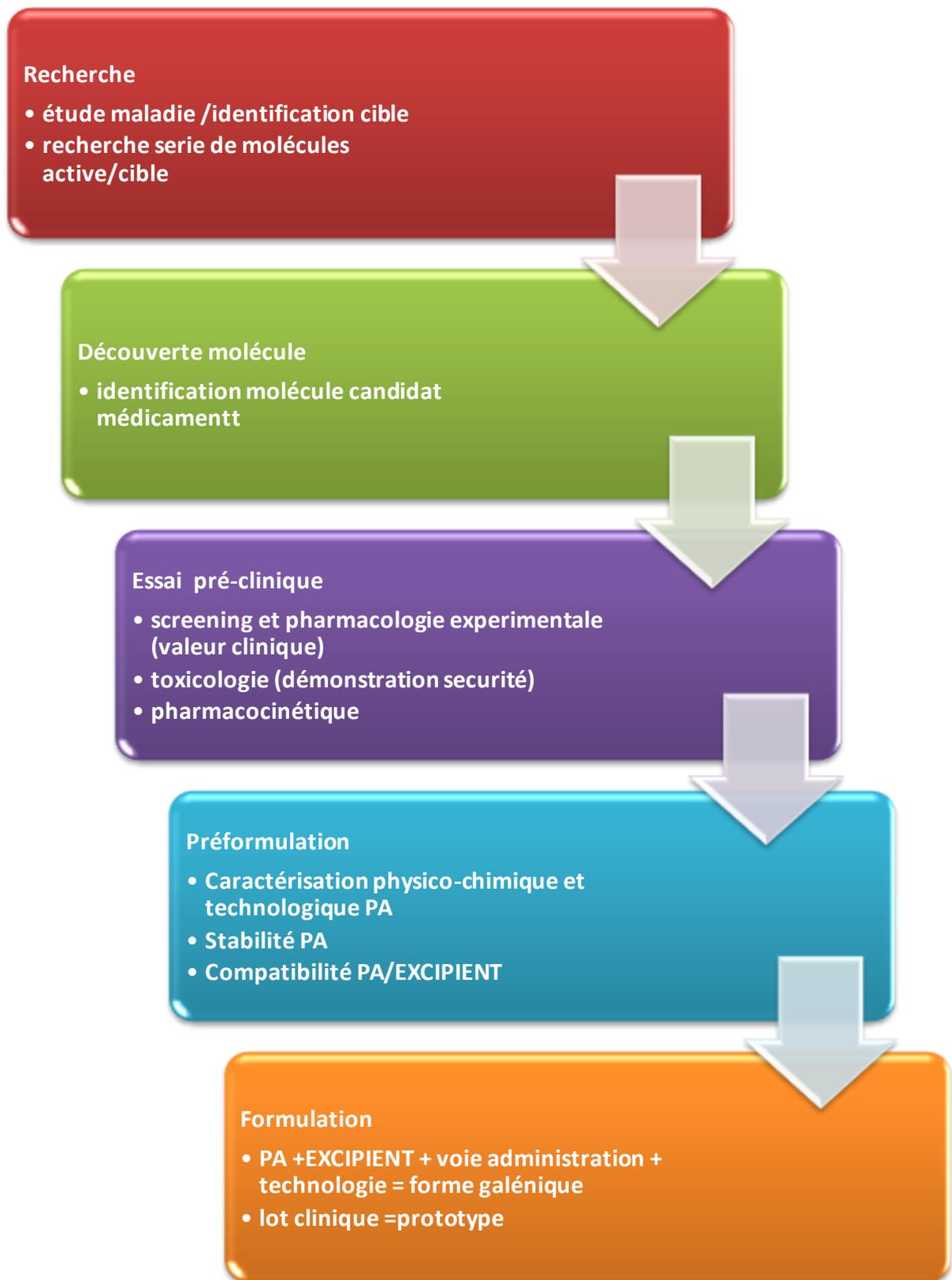


Figure 1 : Les différentes étapes de développement d'un médicament

I.4.L'industrie pharmaceutique :

Une fois mise au point le médicament, c'est-à-dire retenue la dose efficace, choisie la forme la plus appropriée pour la conservation et la libération du principe actif, l'industrie pharmaceutique est chargée de reproduire le prototype un très grand nombre de fois pour sa distribution nationale et internationale. [8]

Dans l'industrie pharmaceutique, on trouve deux grandes entités :

- ❖ les ateliers de production ;
- ❖ les laboratoires de contrôle.

Dans une usine, il y a un sens de circulation pour les matières et un sens de circulation pour le personnel.

L'air respiré dans une unité de fabrication est un air filtré ; les filtres sont renouvelés régulièrement. La pression de l'air est réglée pour qu'il souffle de l'atelier vers la sortie ; La production d'eau purifiée est effectuée dans un local extérieur aux ateliers de production. [5]

Pour assurer la qualité nécessaire aux médicaments fabriqués, les actes de la production se font selon ce qu'on appelle les « **Bonnes Pratiques de Fabrication** » (BPF) c'est-à-dire : la maîtrise de 5 éléments essentiels

(Les 5 M) :

- Main d'œuvre (ensemble du personnel formé, qualifié) ;
- Matériel (locaux adaptés, équipements validés) ;
- Milieu (environnement intérieur et extérieur) ;
- Méthodes (procédés et procédures : écrits, traçabilité) ;
- Matières (matières premières, articles de conditionnement).

I.5. Contrôle qualité des médicaments :

Le contrôle de la qualité consiste à vérifier que des caractéristiques sont conformes à des spécifications préétablies.

Il se fait :

- En amont, sur les intrants (les matières premières).
- En cours de fabrication : étapes intermédiaires (grains, comprimés avant pelliculage...).
- En fin de fabrication, sur le produit fini. [1]

I.5.1. Qualité des matières premières :

On entend par matières premières :

- les matières premières proprement dites, à l'intérieur desquelles il faut distinguer les principes actifs et les excipients,
- les matières premières accessoires, intermédiaires de fabrication (fluides pulseurs, propulseurs), les articles de conditionnement primaire. [7]

Parmi les paramètres importants dans la qualité des matières premières :

- Polymorphisme et pseudopolymorphisme
- Taille des particules
- Les substances apparentées
- Les solvants résiduels
- Les métaux lourds
- Les produits de dégradation

I.5.2. Les récipients :

Le récipient pour usage pharmaceutique est un article qui contient ou qui est destiné à contenir un produit et qui est ou peut être en contact direct avec celui-ci.

La fermeture fait partie du récipient, le verre apporte généralement une certaine sécurité d'inertie, Par contre, les récipients en plastique présentent des inconvénients dus aux interactions contenant-contenu observées principalement avec des contenus liquides. [6]

I.5.3. Etudes de stabilité

« La stabilité d'un médicament peut être définie comme son aptitude à conserver ses propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans des limites spécifiées pendant toute sa durée de validité ».

La stabilité des préparations pharmaceutiques dépend de paramètres extrinsèques (température, humidité et lumière) et intrinsèques.

Parmi ces derniers, il faut différencier les facteurs liés aux matières premières, à la forme pharmaceutique et au conditionnement. [31]

CHAPITRE II

*La qualité
microbiologique
requisse des
différentes
préparations
pharmaceutiques*

Introduction :

La présence de certains micro-organismes dans des préparations non stériles peut réduire voire annuler l'activité thérapeutique du produit, et constitue un danger potentiel pour la santé du patient.

Les fabricants sont donc tenus d'assurer une faible charge microbienne (biocharge) dans les formes pharmaceutiques finies, par la mise en œuvre des textes en vigueur sur les **BPF** au cours de la fabrication, de la conservation et de la distribution des préparations pharmaceutiques.

II.1 Méthode de la pharmacopée européenne :

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des préparations pharmaceutiques, des mesures appropriées doivent être prises pour assurer la qualité microbiologique du produit.

Les préparations pharmaceutiques devraient satisfaire aux essais spécifiés ci-dessous ; On détermine quatre catégories sont définies :

➤ *Catégorie 1 :*

Préparations obligatoirement stériles aux termes de la monographie de la forme pharmaceutique correspondante et autres préparations étiquetées stériles. L'essai de stérilité est appliqué pour cette détermination. [32]

Dans cette catégorie on distingue :

• *Les Formes pharmaceutiques destinées à la voie parentérale*

1) Définition :

Il existe 3 catégories principales de préparation destinées à être injectée, perfusée ou implanté.

-Préparations injectables

Ce sont des solutions, des émulsions ou des suspensions stériles dans l'eau Pour préparation injectable ou un liquide stérile non aqueux ou un mélange de ces deux liquides. Elles doivent être apyrogènes.

- Préparations pour perfusions I.V

Ce sont des solutions aqueuses ou des émulsions en phase aqueuse stériles et apyrogènes. Elles sont destinées à être administrée en grand volume, ce sont les solutés massifs.

- Poudres pour injection ou perfusion I.V

Ce sont des substances solides et stériles réparties dans leur récipient définitif, elles forment rapidement une solution ou une suspension après agitation avec le volume prescrit d'un liquide approprié et stérile.

-Les Implants :

Préparations solides, stériles d'une taille et d'une forme appropriées à l'implantation parentérale. [14]

2) Qualité des préparations injectables :

a) Qualités obligatoires

- Stérilité :

Une préparation injectable ne doit pas contenir de micro-organisme vivant qui provoquerait une infection lors de l'injection.

■ *Essai de stérilité*

Cet essai a pour rôle de déceler la présence de germe. La pharmacopée française énumère un certain nombre de milieux de culture pouvant être utilisés ainsi que les modes opératoires adaptés à l'essai de stérilité des préparations injectables.

La recherche de micro-organismes proposée par la Pharmacopée est basée sur la mise en culture en milieu liquide soit de l'échantillon lui-même (ensemencement direct), soit d'une membrane sur laquelle les micro-organismes ont été recueillis par filtration préalable du produit (filtration sur membrane). [37]

La présence d'un éventuel micro-organisme se matérialise par l'apparition, après incubation à une température et pendant une durée déterminées, d'un trouble du milieu de culture lié à sa multiplication, confirmé par comparaison avec un témoin négatif.

■ *Absence de pyrogène*

Une préparation injectable ne doit pas contenir de substance pyrogène qui provoquerait des excès de fièvre.

➤ *Recherche des pyrogènes*

Les substances pyrogènes, d'origine bactérienne, de nature polysaccharidique, capables de provoquer des symptômes après injections

intraveineuses dont le plus caractéristique est une élévation brusque et importante de température.

Le test est obligatoire pour toutes les préparations parentérales quel que soit leur volume ou bien dans le cas où l'étiquetage de la préparation comporte la mention apyrogène. [38]

Deux méthodes permettent de mettre en évidence la présence ou l'absence de substances pyrogènes :

- Méthode qualitative in vivo basée sur l'élévation de la température chez le lapin à qui on a injecté dans la veine marginale de l'oreille un volume précis de la solution à tester.

L'élévation, éventuelle, de la température constatée ne doit pas dépasser certaines limites pour conclure à l'absence de substances pyrogènes.

La mesure de la température se fait en plaçant des sondes thermiques dans le rectum des lapins d'expérience.

- Méthode semi-quantitative in vitro basée sur la coagulation d'un Lysat de protéines d'améboocytes d'un crabe d'Amérique (**LAL : Limulus Amebocyte Lysat**). **0,1 ml** du soluté est mis en contact de **0,1 ml** du lysat de protéines. [39]

En cas de présence d'endotoxines issues de substances pyrogènes, le mélange des deux liquides donne naissance à un gel ferme.



Figure 2 : limule

- Aspect macroscopique correct :

Les solutions doivent être limpide et ne pas renfermer de particules visibles à l'œil nu ; Les émulsions doivent avoir un aspect homogène et ne pas présenter de séparation des phases. Les suspensions peuvent présenter une sédimentation mais une légère agitation doit redonner une suspension suffisamment stable pour permettre des prélèvements homogènes.

b) Qualités facultatives

Isotonie :

Une préparation injectable doit avoir une pression osmotique aussi proche que possible de celle du sang afin de ne pas risquer de détruire les hématies. La pression osmotique dépend de la quantité de produit dissout dans l'eau. L'isotonie est surtout importante pour les solutés massifs.

En cas d'hypertonie, il faudra faire une injection lente, en cas d'hypotonie il faudra faire une injection très très lente.

3) Récipients utilisés :

a) En verre

Les ampoules et flacons doivent être en verre incolore afin d'éviter une confusion avec les ampoules buvables en verre jaune ; ces avantages sont : la transparence, la résistance à la chaleur, l'inertie chimique et l'imperméabilité aux gaz.

b) En matières plastiques

Les flacons, poches et seringues pré-remplis doivent être en matière plastique transparente, leur avantage la légèreté et la résistance aux chocs.

4) Avantages et inconvénients :

■ ***Avantage :***

- Rapidité d'action, cette voie évite la destruction du principe actif par les sucs digestifs, possibilité d'une action locale, garantit d'absorption de la dose totale du médicament.

■ ***Inconvénients :***

- Risque d'infection, effet douloureux, nécessité d'un personnel compétent, obligation d'un appareillage approprié.

● ***Les Formes pharmaceutiques destinées à la voie oculaire***

Ce sont des préparations destinées à être appliquées sur le globe oculaire et les conjonctives ou à être introduite dans le cul de sac conjonctif de l'œil.

1) Collyres :

Ce sont des solutions ou suspensions stériles, aqueuse ou huileuses contenant un ou plusieurs principes actifs et destinés à l'instillation oculaire.

Les flacons sont multidoses un conservateur antimicrobiens et leurs volumes est limité à **10 ml**.

L'étiquette doit indiquer la durée limite d'utilisation après ouverture (maximum 4 semaines).

Il existe des récipients unidose notamment pour la chirurgie ophtalmologique dont le conditionnement doit renfermer un volume suffisant pour permettre le prélèvement et l'administration de la dose nominale par une technique normale.

2) Les solutions pour lavage oculaire :

Ce sont des solutions aqueuses, stériles destinées à rincer ou à baigner les yeux ou encore imbiber des compresses oculaires. Elles ont les mêmes caractéristiques que les collyres sauf que les flacons multidoses contiennent au **max 200 ml** ; Elles servent à plusieurs prélèvements, à différents moments de la journée.

- Ce sont des flacons sertis par un bouchon en polymère
- Agent antimicrobien. [14]

Les autres catégories regroupent les Formes transmuqueuses qui sont :

1) Sublinguales

2) ORL

3) Pulmonaires

4) Rectales

5) Vaginales

➤ Catégorie 2 :

Préparations pour application locale ou pour administration dans les voies respiratoires à l'exception des préparations obligatoirement stériles, et dispositifs transdermiques dans ce cas il faut comme des tests :

✓ Dénombrement des germes aérobies viables totaux au maximum **10²** micro-organismes (bactéries aérobies plus moisissures et levures)/g, /ml ou par dispositif transdermique (Film protecteur et couche support compris).

— Entérobactéries et certaines autres bactéries gram-négatives.

Pour les Dispositifs transdermiques :

- Absence de bactéries, vérifiée sur 1 dispositif.
- Autres préparations : au maximum **10** bactéries /g ou /ml.
- Absence de **Pseudomonas aeruginosa**, vérifiée sur **1 g, 1 ml** ou **1** dispositif.
- Absence de **Staphylococcus aureus**, vérifiée sur **1 g, 1 ml** ou **1** dispositif ; dans cette catégorie on a ce qu'on appelle :

- **Les Formes pharmaceutiques destinées à la voie respiratoire**

Ce sont des préparations solides ou liquides destinées à être administrées sous forme de vapeur, d'aérosol ou de poudre dans la partie inférieure des voies respiratoires en vue d'une action locale ou systémique. [32]

1) Liquides pour nébulisation :

Ce sont des solutions, des suspensions ou des émulsions aqueuses destinées à être converties en aérosol au moyen de nébuliseur. Les aérosols sont constitués par une dispersion de particules liquides dans un gaz.

2) Inhalateurs pressurisés à valve doseuse :

Ils sont constitués d'une solution, suspension ou émulsion conditionnée dans un récipient comportant une valve doseuse et maintenu sous pression avec un gaz propulseur liquéfié.

L'ouverture de la valve permet l'injection d'une quantité déterminée de médicaments, sous forme d'aérosol quelque soit la durée d'ouverture.

Les gaz utilisés sont le butane ou le propane.

3) Inhalateurs à poudre sèche :

Ce sont des dispositifs permettant l'inhalation d'une poudre médicamenteuse sous l'effet d'une profonde inspiration ; Formes multidoses, la quantité de poudres est mesurée à chaque utilisation par un système doseur intégré dans l'inhalateur ou des formes uni doses dans une cupule portée par un disque qui est introduit dans l'inhalateur. [14]

➤ **Catégorie 3 :**

A : Préparations pour administration par voie orale ou rectale dans ce cas il faut :

- ✓ Dénombrement des germes aérobies viables totaux.

Au maximum **10³** bactéries et **10²** moisissures et levures /g ou /ml.

— Absence d'Escherichia coli (**1 g ou 1 ml**).

B : Préparations pour administration orale contenant des matières premières d'origine naturelle (animale, végétale ou minérale) lorsqu'un prétraitement antimicrobien est impossible et que l'autorité compétente admet une contamination microbienne des matières premières supérieure à 10^3 micro-organismes viables par gramme ou par millilitre. [32]

Sont exclus les médicaments à base de plantes décrits dans la catégorie 4.

On distingue :

- ***Les Formes pharmaceutiques destinées à la voie rectale***

- Elles permettent une action locale ou systémique du principe actif.

- 1) **Les suppositoires :**

Ce sont des préparations solides qu'il faut garder dans le réfrigérateur, contenant une unité de prise du principe actif. Leurs formes, volumes et consistances sont adaptées à l'administration par voie rectale.

- 2) **Suspensions et solutions à usage rectales :**

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 adapté à l'administration dans le rectum.

- ***Les Formes pharmaceutiques destinées à la voie orale***

- A) **Les formes solides :**

Principale avantage est la conservation du principe actif est la meilleure possible dans les produits secs ; Les formes solides constituent **55 %** des médicaments.

- 1) **Poudres orales :**

Ce sont des préparations constitué de particule solides, libres, sèches et plus ou moins fines. Elles peuvent être effervescentes.

Elles sont absorbées parfois à la cuillère et parfois après suspension dans l'eau. Boite multidose où l'on prélève avec une cuillère à café.

Leur inconvénient est la quantité de poudre prélevé varie selon que la cuillère est plus ou moins à raser. [14]

2) Formes obtenues par répartition des poudres dans des enveloppes :

Bonne sécurité d'emploi puisque l'on connaît exactement la quantité de principe actif administré à chaque fois que le patient absorbe une unité de prise.

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.

b) Les gélules ou capsules dures

Constituée d'une enveloppe de forme cylindrique à base hémisphérique renfermant une unité de prise du médicament.

L'enveloppe est constitué de deux capsules à emboîtement dont la paroi à base de gélatine est dure et mince. Le contenu peut être pulvérulent ou granuleux ; Ce sont des formes industrielles très utilisées leur avantage est que la fabrication simple et rapide, principe actif très vite libéré dans le tube digestif par destruction de l'enveloppe, en pédiatrie on peut vider la gélule dans les aliments.

3) Formes obtenues par traitement des poudres :

a) Comprimés

Formes pharmaceutique la plus répandue, uniquement industrielle.

Leur préparation de consistance solide obtenu en agglomérant par compression des particules de poudres renfermant une unité de prise du médicaments avalé, croqué ou dissout dans l'eau.

Avantages:

- Solidité suffisante pour résister aux manipulations,
- conservation facile,
- possibilité de fabriquer de nombreuses variétés.

- **Comprimés non enrobés** : plus simple et plus répandue
- **Comprimés effervescents** : renferment dans leur composition des produits acides et bicarbonate qui réagissent rapidement avec l'eau libération de gaz carbonique. Dissolution rapide.
- **Comprimés solubles ou dispersibles** : comme les effervescents mais sans effervescence, enrobés ou non, facilement mis en solution ou en suspension dans l'eau avant absorption.
- **Comprimés enrobés** : recouvert d'une ou plusieurs couches constituant l'enrobage, lorsque l'enrobage est très mince (comprimé pelliculé).
- **Comprimés gastorésistants** : destiné à résister aux sucs gastriques et à libérer leur principe actif dans l'intestin. Ils sont utilisés pour les principes actifs détruits par l'acidité gastrique.
- **Comprimés à libération modifiée** :

Enrobés ou non dont les excipients spéciaux et les procédés de fabrication particulier permettent de modifier la vitesse ou le lieu de libération du principe actif.

Comprimé à libération prolongé dont le principe actif est libéré durant un temps assez long. Cela réduit le nombre de prise journalière, ils ne doivent pas être écrasés.

- **Comprimés à utiliser dans la cavité buccale** :

Destinés à se dissoudre dans la bouche, 2 applications :

- Comprimé à sucer avec action locale du principe actif,
- Comprimé sublingual avec absorption de principe actif par la muqueuse buccale qui permet un effet général.

b) Granulés

Ce sont des préparations constituées par des grains solides et secs formés par agrégation de particules de poudre. Avalés tels quels, croqués, dissout ou désagrégés dans l'eau, effervescent. Présentés soit dans une boîte multidoses où l'on prélève à la cuillère soit en dose unitaire.

4) Capsules molles :

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

Enveloppe = gélatine élastique, contenu pâteux ou liquide, conservé à l'abri de la chaleur.

B) Les formes liquides :

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

1) Formes multidoses :

a) Sirops

Préparation aqueuse de saveur sucré 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.

(Cuillère à café : **5 ml**, cuillère à dessert : **10 ml**, cuillère à soupe : **15 ml**).

b) Liquides pour admission orale

Solution, émulsion ou suspension contenant un ou plusieurs principes actifs dans un solvant approprié : eau, alcool et les huiles. Administration à la cuillère ou par goutte diluée dans l'eau.

5) Formes unitaires :

a) Ampoules buvables

Répartition d'un soluté buvable dans des ampoules (en verre jaune ; Ampoule injectable : verre incolore). [14]

● Catégorie 4 :

Médicaments à base de plantes exclusivement composés d'une ou plusieurs drogues végétales (entière, en fragments ou en poudre). Dans ce cas il faut :

✓ Dénombrement des germes aérobies viables totaux.

Au maximum **10^4** bactéries et **10^2** moisissures et levures /**g ou /ml**.

— Entérobactéries et certaines autres bactéries gram-négatives.

Au maximum **10^2** bactéries par gramme ou par millilitre.

— Absence de **salmonelles (10 g ou 10 ml)**.

— Absence de **Escherichia coli (1 g ou 1 ml)**.

— Absence de **Staphylococcus aureus (1 g ou 1 ml)**.

A : Médicaments à base de plantes dont l'emploi fait intervenir de l'eau bouillante les limites sont :

✓ Dénombrement des germes aérobies viables totaux.

Au maximum 10^7 bactéries et 10^5 moisissures et levures /g ou /ml.

— Au maximum 10^2 Escherichia coli par gramme ou par millilitre.

B : Médicaments à base de plantes dont l'emploi ne fait pas intervenir d'eau bouillante.

Les limites de contamination données en exemple doivent être interprétées comme suit :

Lorsque la valeur est de 10^2 micro-organismes, la valeur maximale acceptable est de 5×10^2 ; lorsqu'elle est de 10^3 micro-organismes,

La valeur maximale acceptable est de 5×10^3 , est ainsi de suite.

Dans le cas d'un plan d'échantillonnage à trois niveaux après calcul du nombre de germes viables totaux pour chacun des échantillons, le produit satisfait à l'essai si :

- aucun des résultats individuels obtenus n'est supérieur d'un facteur **10** ou plus à la limite prescrite ;
- le nombre de résultats individuels se situant entre la limite prescrite et **10 fois** cette limite est inférieur à **2**.

II.2. La qualité microbiologique des substances pour 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**). (**Tableaux 1 -2**)

Ces critères d'acceptation reposent sur des résultats individuels, ou sur des résultats moyens lorsque l'on effectue plusieurs dénombrements, par exemple pour les dénombrements sur plaques.

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

— 10^1 UFC : nombre maximum acceptable = **20** ;

— 10^2 UFC : nombre maximum acceptable = **200** ;

— 10^3 UFC : nombre maximum acceptable = **2000**, et ainsi de suite.

Le **tableau 6** 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 de patients visée* :

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. [32]

Tableau 1: critères d'acceptation de la qualité microbiologique des substances pour usage pharmaceutique non stériles. [32]

	DGAT (UFC/g ou UFC/ml)	DMLT (UFC/g ou UFC/ml)
Substances pour usage pharmaceutique	10³	10²

Tableau 2 : critères d'acceptation de la qualité microbiologique des formes pharmaceutiques non stériles. [32]

Voies d'administration	DGAT (UFC/g) ou (UFC/ml)	DMLT (UFC/g) ou (UFC/ml)	Microorganismes spécifiés
Voie orale : préparations non aqueuses	10³	10²	Absence d' <i>Escherichia coli</i> (1 g ou 1 mL)
Voie orale : préparations aqueuses	10²	10¹	Absence d' <i>Escherichia coli</i> (1 g ou 1 mL)
Voie rectale	10³	10²	
Voie buccal Voie gingivale Voie cutanée Voie nasale Voie auriculaire	10²	10¹	Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g ou 1 mL) Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g ou 1 mL)
Voie vaginale	10²	10¹	Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g ou 1 mL) Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g ou 1 mL) Absence de <i>Candida albicans</i> (1 g ou 1 mL)
Voie transdermique (limites pour un dispositif transdermique, film protecteur et support compris)	10²	10¹	Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1 dispositif) Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 dispositif)
Inhalation (des exigences spécifiques s'appliquent aux préparations liquides dispensées au moyen de nébuliseurs)	10²	10¹	Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g ou 1 mL) Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g ou 1 mL) Absence de bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires (1 g ou 1 mL)
Disposition spéciale de la Ph. Eur. pour les préparations pour administration par voie orale contenant des matières premières d'origine naturelle (animale, végétale ou minérale), lorsqu'un prétraitement antimicrobien est impossible et que l'Autorité compétente admet une DGAT des matières premières supérieure à 10 ³ UFC/g ou UFC/mL.	10⁴	10²	Au maximum 10² UFC de bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires (1 g ou 1 mL) Absence de salmonelles (10 g ou 10 mL) Absence d' <i>Escherichia coli</i> (1 g ou 1 mL) Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g ou 1 mL)

CHAPITRE III

*Les paramètres
à maîtriser afin
d'assurer et
conserver la
qualité
microbiologique
des médicaments*

Introduction :

Les précautions à prendre pour limiter la charge microbienne avant la stérilisation comprennent l'utilisation de composés présentant un niveau suffisamment faible de contamination microbienne.

Une surveillance microbiologique et l'établissement de limites appropriées peuvent être souhaitables pour les composants comportant des risques de contamination en raison de leur origine, de leur nature ou de leur mode de préparation. Les méthodes décrites ici s'appliquent principalement à l'inactivation ou l'élimination des bactéries, levures et moisissures.

Toutefois, pour les produits d'origine biologiques, ou lorsque du matériel d'origine animale ou humaine est utilisé pour la production, il est nécessaire de démontrer dans le cadre de la validation que le procédé utilisé permet d'éliminer ou d'inactiver les contaminants viraux potentiels.

III. 1. La stérilisation:

La Stérilisation est la mise en œuvre d'un ensemble de méthodes et de moyens visant à éliminer (ou détruire) tous les micro-organismes vivants (bactérie, virus, champignons).

Elle s'exprime en terme de probabilité, le risque retenu est d'avoir au plus un micro-organisme vivant pour 10^6 unités soumise à la stérilisation.

C'est le « Niveau d'Assurance de Stérilité (NAS) »

La stérilisation s'applique :

- Aux formes qui selon la pharmacopée doivent être stériles :
Préparations injectables, collyres.
- A certaines préparations dont la conservation exige l'absence des germes : gels oraux.
- Au matériel chirurgical, ligatures, articles de pansement, articles à usage unique, vêtements des personnes travaillant en ambiance stérile.
- A certaines enceintes de l'industrie pharmaceutique et des hôpitaux blocs et hottes stériles. [33]

III.1.1. Les différents modes de la stérilisation :

III.1.1.1. Stérilisation par la chaleur :

III.1.1.1.1. Sensibilité des micro-organismes à la chaleur :

La sensibilité des micro-organismes à un traitement thermique donnée est fonction :

a. L'espèce microbienne et la forme sous laquelle elle se trouve :

Pour une espèce donnée, les spores sont plus résistantes que les formes végétatives.

b. Durée et nombre de germes :

Lorsqu'on soumet une suspension de micro-organismes à une certaine Température pendant un certain temps le nombre de germe varie en sens inverse de la durée du traitement suivant une relation logarithmique :

$$\text{Log } N/N_0 = K t$$

N₀ : nombre de germe initial.

N : nombre de germe au temps t.

- Si par exemple on part d'une suspension contenant **10⁶** spores/ml et si **D** représente la durée de chauffage (à une température donnée) qui entraîne dans les conditions de l'expérience une réduction de **90 %** de la population microbienne.

(**D** peut varier de **0,2** à **2** minutes suivant les micro-organismes), cette expérience représentée dans (**Tableau 3, Figure 3**).

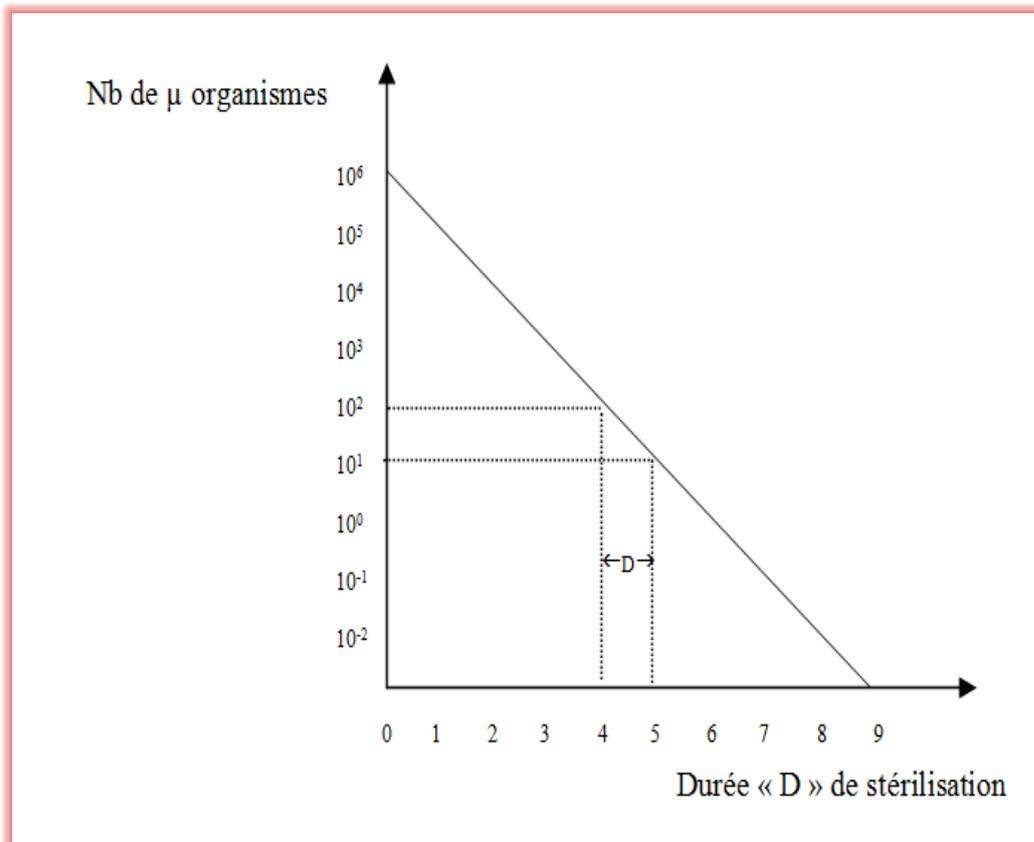


Figure 3: courbe de survie des microorganismes à un traitement thermique de durée « D » [33]

NB : 10^{-1} (= non pas 1/10 germe mais 1germe possible/10unités)

Tableau 3 :

Nombre de survies en fonction de la durée de chauffage [34]

<i>Durée de chauffage</i>	<i>Nombre de microorganismes détruits (90%)</i>	<i>Nombre de survies</i>	
0D	0	1000000	10^6
1D	900 000	100000	10^5
2D	90 000	10000	10^4
3D	9000	1000	10^3
4D	900	100	10^2
5D	90	10	10^1
6D	9	1	10^0
7D	0,9	0,1	10^{-1}
8D	0,09	0,01	10^{-2}
9D	0,009	0,001	10^{-3}
10D	0,0009	0,0001	10^{-4}
11D	0,00009	0,00001	10^{-5}
12D	0,000009	0,000001	10^{-6}

Conclusions :

- Le risque de survie après un traitement thermique donné est d'autant plus faible qu'il y'avait moins de germes au départ.
- Il n'est théoriquement pas possible d'atteindre la stérilité absolue.

c. La température :

Lorsqu'on étudie expérimentalement le temps nécessaire à la destruction d'une espèce microbienne donnée en fonction de la température, on obtient une courbe logarithmique qui tracée sur une échelle semi-logarithmique

donne une droite. Plus La température augmente, moins de temps faudra pour atteindre le même résultat. (Figure 4).

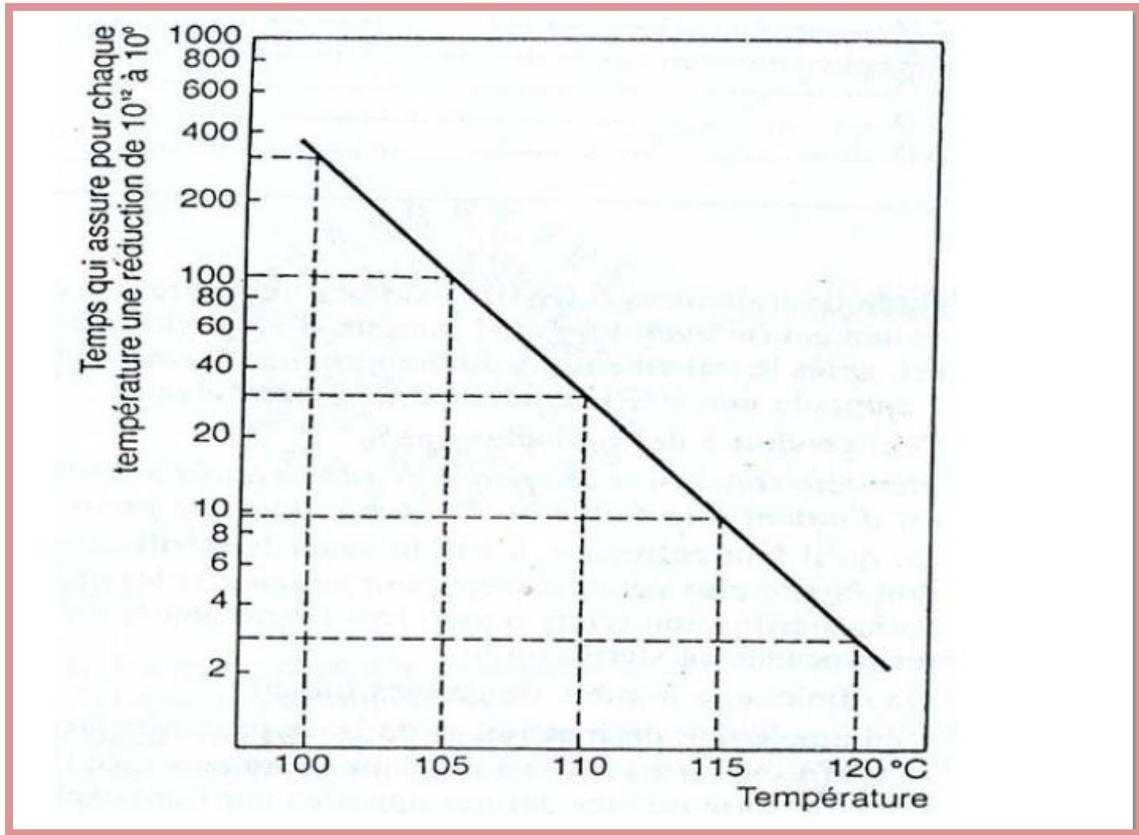


Figure4:

Destruction des spores de Clostridium Botulinum parla chaleur. [33]

d. Nature du milieu :

- **Humidité** : les germes sont beaucoup plus difficiles à détruire en milieu sec qu'en milieu humide. En chaleur sèche, le germe de référence pour le calcul de la valeur stérilisatrice est **Bacillus subtilis** (T réf = 170 °C)
- **Principe actif** : certains principes actifs possède un pouvoir bactéricide qui ne se manifeste qu'après élévation de la température, exemple :
Le salicylate de sodium, le carbonate acide de sodium.
- **pH** : la destruction des micro-organismes est plus aisée en milieu acide ou alcalin. [34]

III.1.1.1.2. Procédés de stérilisation par la chaleur :

a. Chaleur sèche :

La température de stérilisation est dans ce cas de **180°C** pendant **1** heure.

La chaleur sèche entraîne un durcissement des cellules externes des germes, qui les protégera contre la pénétration de la chaleur. C'est pour cela que la stérilisation par la chaleur sèche nécessite des traitements plus longs et des températures plus élevées que la stérilisation par la chaleur humide.

En raison des températures élevées qu'il faut atteindre, la chaleur sèche est réservée aux produits (matériels ou médicaments) thermostables qui ne supportent pas la vapeur,

Exemples : Liquides non-aqueux, poudres difficile à produire aseptiquement, matériels en verre ou en acier inox ...

- Le flamage
- Four Pasteur ou stérilisateur poupinel. (**Figure5**).



Figure 5 : Stérilisateur poupinel

b. Chaleur humide :

La température de stérilisation est dans ce cas **121°C** pendant **20 min**.

La chaleur humide permet l'inactivation des micro-organismes à des températures et des temps inférieurs à ceux nécessaires en chaleur sèche. Ceci s'explique par le fait que le milieu humide favorise la diffusion et la pénétration de la chaleur dans les cellules, par augmentation de la perméabilité de la membrane des spores. L'action conjuguée de l'humidité et de la chaleur permet la dénaturation des protéines bactériennes par hydrolyse et coagulation.

- ***Les autoclaves :***

L'autoclavage reste la technique la plus fiable, la plus sûre et la moins couteuse dans la pratique pharmaceutique. Enceinte classiquement cylindrique, en acier inoxydable munie d'un couvercle. **(Figure 6).**

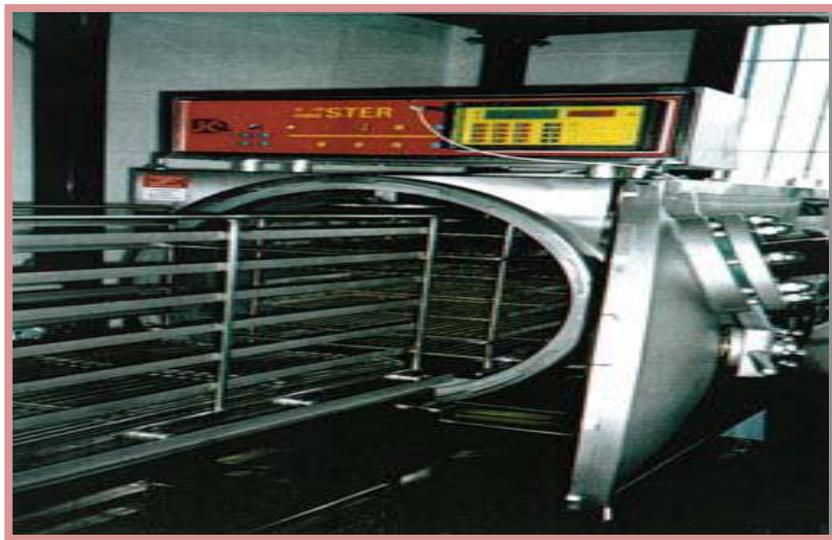
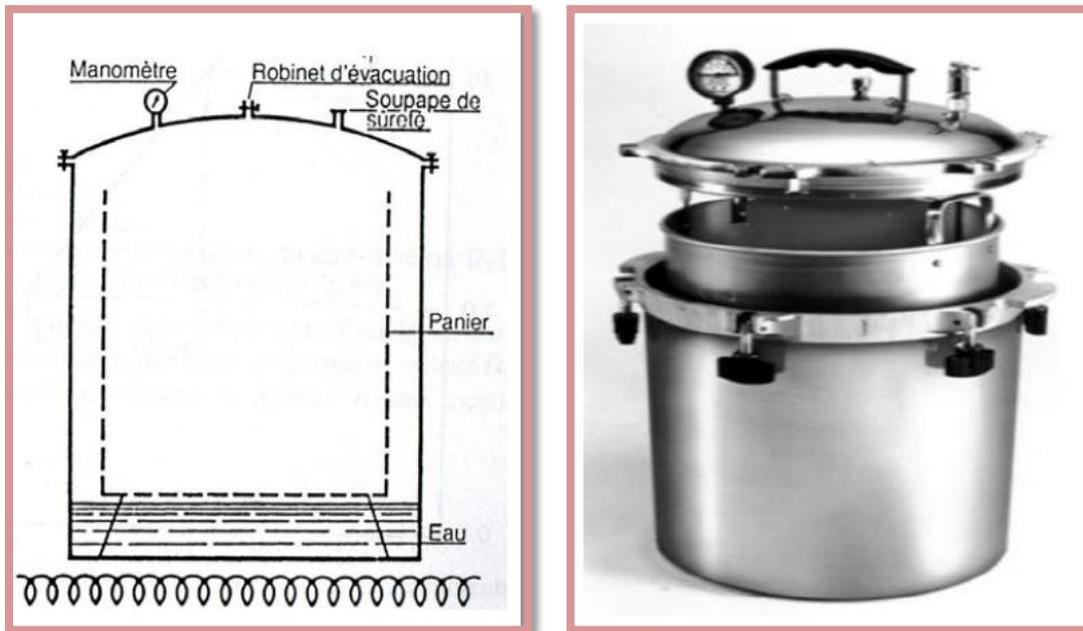


Figure 6 : Autoclaves

-Stérilisateur à la vapeur sous pression en continu : **(Figure 7).**

- Il est réservé pour la stérilisation des préparations importantes, tel que les solutés pour perfusion (le sérum salé ou glucosé).

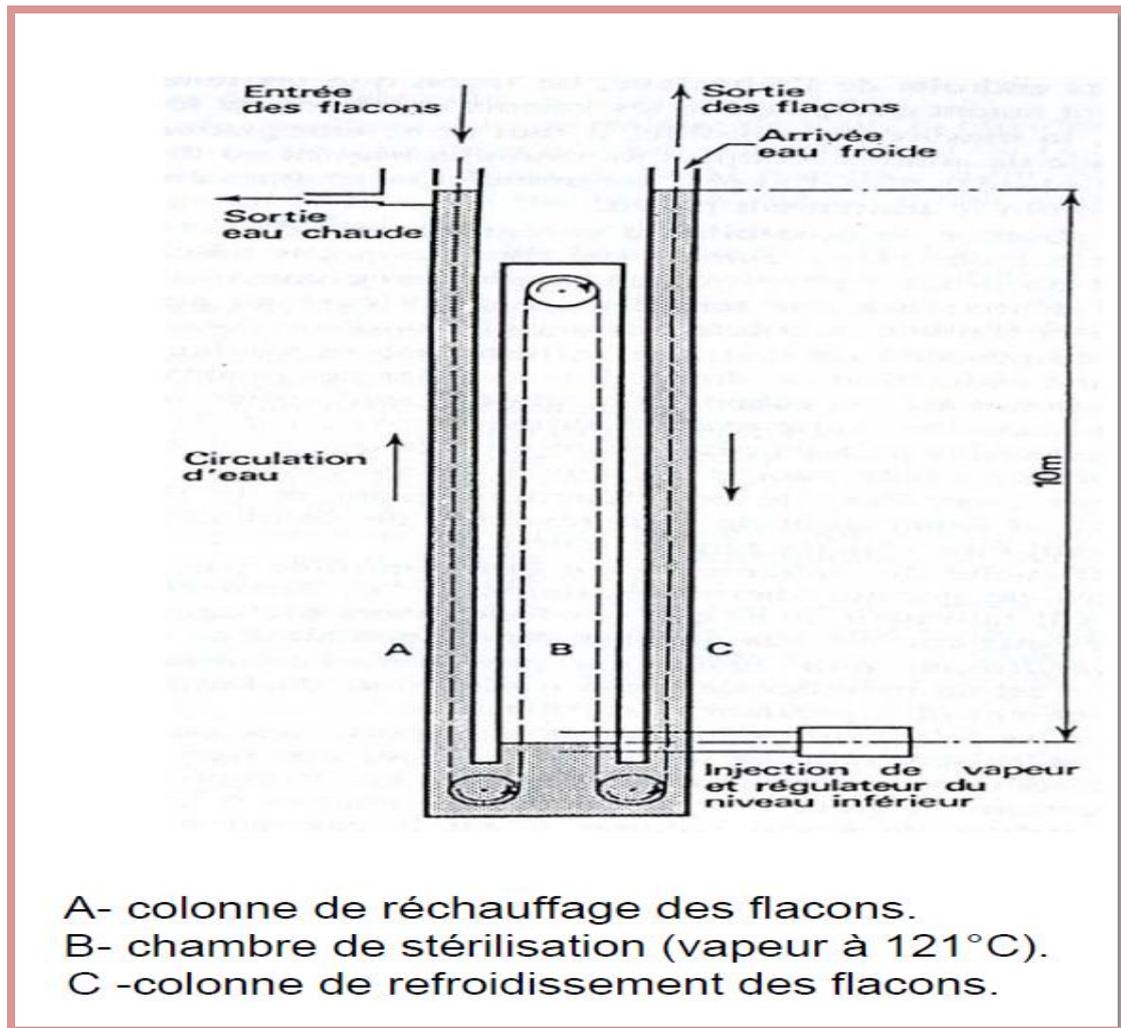


Figure 7 : Stérilisateur à la vapeur sous pression en continu. [33]

L'appareil est constitué de deux colonnes d'eau qui maintiennent sous pression la partie inférieure de l'appareil dans laquelle est injectée de la vapeur sous pression, à une température de **120°C**.

Les flacons à stériliser arrivent en continu dans le stérilisateur au fur et à mesure de leur remplissage, ou ils sont stérilisés par un séjour de **20 à 30 min** dans la vapeur à **120°C**, puis sont refroidis avant leur sortie de l'appareil.

- **Contrôles en cours de la stérilisation**

- Les paramètres physiques : température, pression et durée.
- Indicateurs de passage : on peut utiliser des tubes témoins qui contiennent un produit chimique plus un colorant, si le tube se trouve dans une température supérieure au point de fusion du produit il y aura fusion et coloration. On peut placer aussi des sparadraps (ruban adhésif) collé sur les

produits à stériliser et dont la couleur varie avec la température et le temps de stérilisation.

III.1.1.2. Stérilisation par filtration :

Les médicaments fragiles, thermosensibles, ne peuvent pas supporter une stérilisation classique par la chaleur, il est alors nécessaire de recourir à la stérilisation par filtration.

Ce procédé applicable aux fluides liquides ou gaz est basé sur la rétention des micro-organismes et particules par un réseau filtrant de porosité variable. Cette rétention se fait soit par criblage, soit par adsorption, soit par les deux à la fois.

Selon la taille des particules à retenir, on parle de :

- Particules $> 10 \mu\text{m}$ = Filtration
- $10 \mu\text{m} >$ Particules $> 0,02 \mu\text{m}$ = Microfiltration
- Particules $< 0,02 \mu\text{m}$ = Ultrafiltration [1]

III.1.1.2.1. Filtres stérilisants : (Figures 8 et 9)

- a. *Filtres en profondeur* : agissent soit par criblage soit par adsorption, ils sont stérilisables et certains retiennent les substances pyrogènes.
- b. *Membranes filtrantes (filtre écran)* : elles sont très fines, agissent surtout par criblage et sont stérilisables.



Figure 8 : Types de filtres

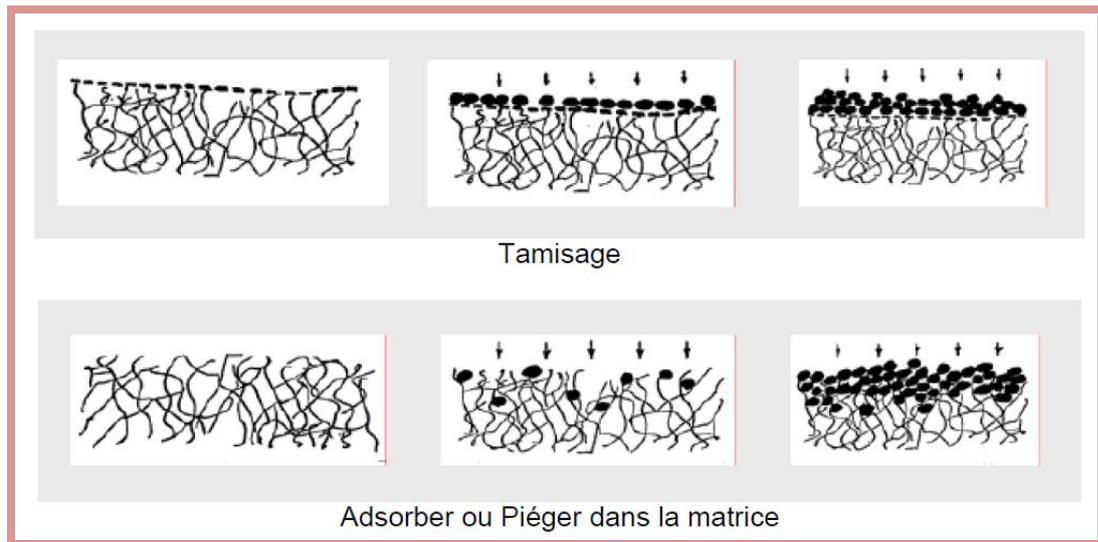


Figure 9 : Mécanisme de la filtration stérilisante [34]

III.1.1.2.2. Conduite de la filtration stérilisatrice :

- . Stériliser à l'autoclave tout le matériel de filtration et de répartition.
- . Partir d'une solution aussi pauvre en germe que possible.
- . Assurer un débit régulier, éviter toute surpression et ne pas prolonger la filtration.
- . Les filtres rigides réutilisables doivent être contrôlés périodiquement car leur porosité peut évoluer. [33]

III.1.1.3. Stérilisation par les rayonnements :

III.1.1.3.1. Les rayons Ultraviolet :

Ils sont doués d'un pouvoir microbicide très élevé.

En pharmacie ce mode de stérilisation ne peut être appliqué aux préparations en ampoules ou flacons car les rayons UV ne peuvent franchir les parois de verre (La stérilisation UV est un phénomène de contact, seules les surfaces en contact direct avec les rayonnements sont stérilisées.) [34]



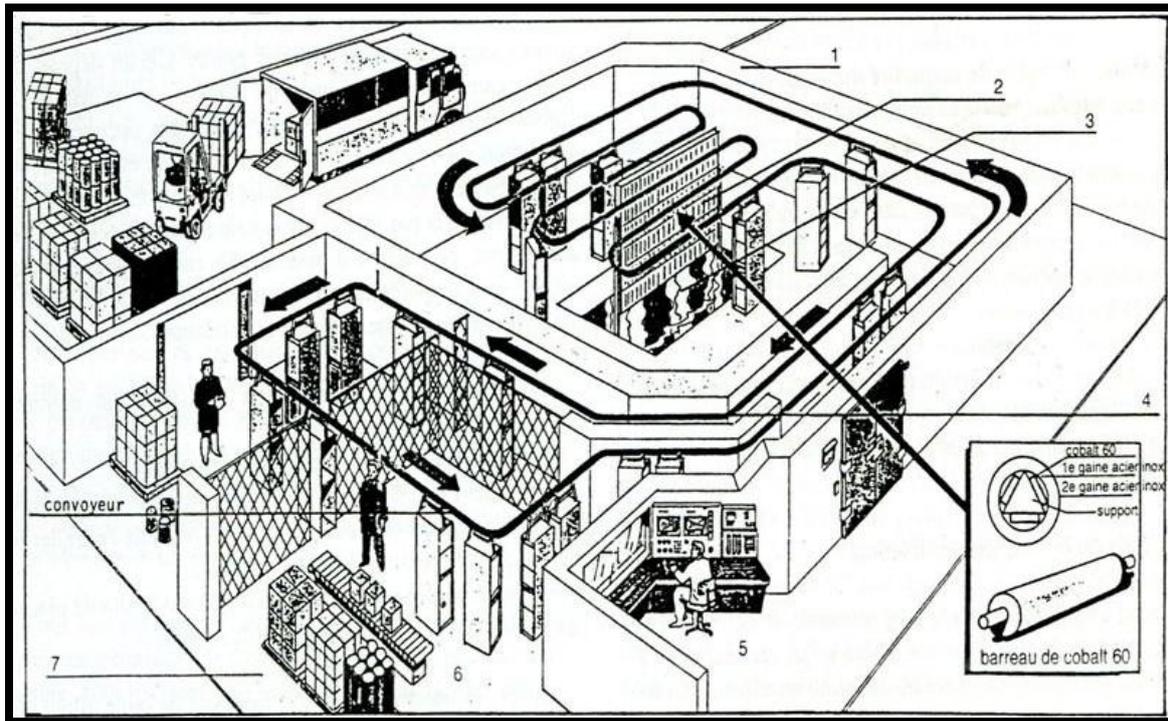
Figure 10 : stérilisateurs UV

II.1.1.3.2. Les ionisants les rayonnements Béta (β) et Gamma (γ) :

Les rayons ionisants sont bactéricides par ionisation des protéines et de l'ADN (effet direct) et par radiolyse de l'eau (effet indirect).

La radio-stérilisation est obtenue soit des radio-éléments, type Cobalt 60, qui émettent des photons gamma, très bactéricides et très pénétrants, soit par les accélérateurs d'électrons qui émettent un rayonnement Béta.

En raison de la nature du procédé, la radio-stérilisation ne peut être réalisée que par un centre spécialisé. (**Figure.11**).



1. Paroi de cellule 2.50m à 3m de béton.
2. Source plane constituée par la juxtaposition de barreaux de cobalt 60 .
3. Piscine pour stockage de la source en position repos.
4. Labyrinthe de sortie.
5. Tableau de commande : programmation des traitements, contrôle de sécurité, enregistrements des paramètres de fonctionnement.
6. Balancelle chargée prête pour l'irradiation.
7. Aire de chargement, colis sur palettes, étiquetage et pastillage des colis, changement des balancelles, pose des dosimètres, acheminement dans la cellule d'irradiation par labyrinthe d'entrée.

Figure 11 : Schéma d'une installation industrielle

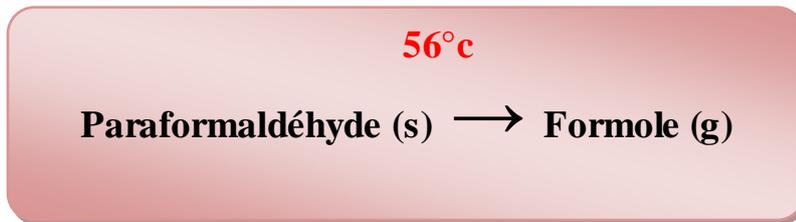
Ce type de stérilisation est applicable pour le matériel à usage unique matériels médicochirurgical C'est un procédé de stérilisation très intéressant, il n'utilise pas de gaz toxique, ni de vapeur, ni de chaleur et il permet de traiter des quantités importantes à la fois, mais les installations sont très lourdes et très coûteuses.

III.1.1.4. Stérilisation par les gaz :

Elle est applicable au matériel dans des conditions déterminées de température, de durée, d'humidité et de concentration.

III.1.1.4.1. Le formaldéhyde :

On l'utilise pour la désinfection du matériel et pour les enceintes stériles. C'est un gaz qui est peu pénétrant donc on l'utilise comme désinfectant de surface. On l'utilise sous forme de :



III.1.1.4.2. L'acide peracétique :

C'est un liquide incolore l'efficacité est due a la libération d'oxygène sous forme atomique ; La méthode classique consiste à chauffer à **40 – 47°C** une solution à **3,5 %** d'acide peracétique et à faire passer à la surface de cette solution de l'air qui circulera ensuite dans l'enceinte à stériliser. En plus de sa grande toxicité, l'acide peracétique présente l'inconvénient majeur de provoquer la corrosion des métaux. Tout le matériel doit être en verre ou en matière plastique. [34]

III.1.1.4.3. L'oxyde d'éthylène :

Il est appliqué pour le matériel médico-chirurgical qui ne supporte pas la stérilisation à l'autoclave ; Ce type de stérilisation peut être manipulé dans les établissements pharmaceutiques et dans les hôpitaux.

C'est un gaz toxique pour le personnel et très réactif, il forme avec des nombreux gaz des mélanges explosifs. [34]

III.2. Enceintes stériles et conditionnement aseptique :

La fabrication des médicaments stériles nécessite un environnement particulier afin d'éviter les contaminations particulières, microbiennes et pyrogéniques.

III.2.1. Définition de l'asepsie et comment la garantir :

L'asepsie est l'ensemble des précautions prises pour empêcher tout apport exogène de micro-organismes ; La préparation aseptique a pour but de maintenir la stérilité d'un produit obtenu à partir de composants préalablement stérilisés. Pour cela, différents paramètres doivent être contrôlés, tels que l'environnement, le personnel, et les surfaces critiques.

III.2.2. Le travail en asepsie :

Le travail en asepsie requiert des précautions particulières. Il s'agit ici d'agir contre la nature. En effet, les micro-organismes sont omniprésents et l'asepsie demande de les éliminer. Le fait de travailler dans des conditions d'asepsie permet de garder un médicament stérile, si celui-ci est déjà stérile à la base, c'est-à-dire exempt de micro-organismes viables. Pour cela, de nombreux contrôles doivent être pris en considération, tels que des contrôles microbiologiques ou particuliers.

Des normes doivent également être respectées, concernant par exemple la pression dans les différentes classes de salles, le nombre de particules, la manière de s'habiller. [25]

III.2.2.1. Travail sous flux laminaire vertical :

L'opérateur travaillant sous flux vertical porte une tenue adéquate :

(Blouse, gants... ext).

Il est recommandé de travailler avec des gants stériles qui seront décontaminés régulièrement avec de la teinture de chlorhexidine, par exemple, afin de garder au mieux les conditions aseptiques au cours de la session de travail.

Avant de commencer les manipulations, il faut préparer la place de travail, allumer le flux laminaire **15** minutes avant, décontaminer le plan de travail et y mettre un champ stérile. Le matériel qui rentre sous flux devrait être décontaminé et le matériel emballé stérilement, pelé sous flux.

Les objets sous le flux sont disposés de manière à ne pas provoquer de turbulences de l'air, les uns à côté des autres plutôt que l'un sur l'autre. Il faut éviter d'appuyer ses avant-bras sur les grilles d'aspiration de l'air. Il y a, sur le plan de travail, un côté « propre » et un côté « sale », et le travail s'effectue toujours dans un même sens, du propre vers le sale. La préparation se fait de manière extemporanée avant administration. [20]



Figure 12 : Flux laminaire verticale [20]

III.2.3. Enceintes stériles : On distingue :

a. Enceinte stériles classiques :

- Les vitrines stériles
- Les salles ou blocs stériles

b. Enceintes stériles à flux d'air laminaire :

- Les salles blanches stériles à flux d'air laminaire.
- Les hottes ou poste de travail stérile à flux d'air laminaire. [24]

III.2.3.1. Atmosphère des enceintes stériles :

L'atmosphère est naturellement chargée d'une flore bactérienne de base, à laquelle vient parfois se joindre une flore accidentelle pathogène, surtout dans les lieux fréquentés par des êtres vivants.

L'élimination des micro-organismes en suspension dans l'air se fait essentiellement par filtration, à l'aide de filtres stérilisants précédés de préfiltres (dépoussiérage, arrêt d'une forte proportion de micro-organismes, évite le colmatage rapide des filtres).

Dans la centrale de traitement d'air on trouve également des appareils de réglage de l'humidité et de la température indispensables dans les enceintes stériles.

Par mesure de sécurité supplémentaire, des tubes à UV germicides sont placés dans les gaines d'entrée d'air après les filtres stérilisants.

Les enceintes à flux d'air laminaire (flux vertical ou horizontal) dont la totalité de l'air se déplace à une vitesse uniforme le long de lignes parallèles avec le minimum de tourbillons, comportent :

- Face d'entrée d'air stérile après passage sur filtres absolus

(HEPA : haute efficacité pour les particules de l'air, > 99,99 %) :

- filtres de fibre verre en plaque pliés.

- Face de sortie avec un système de reprise d'air.

Les ventilateurs sont réglés de telle manière que la pression va en décroissant de l'intérieur vers l'extérieur pour que les mouvements d'air se fassent dans le sens d'une enceinte moins contaminée vers une enceinte plus contaminée en cas de non étanchéité. [28]

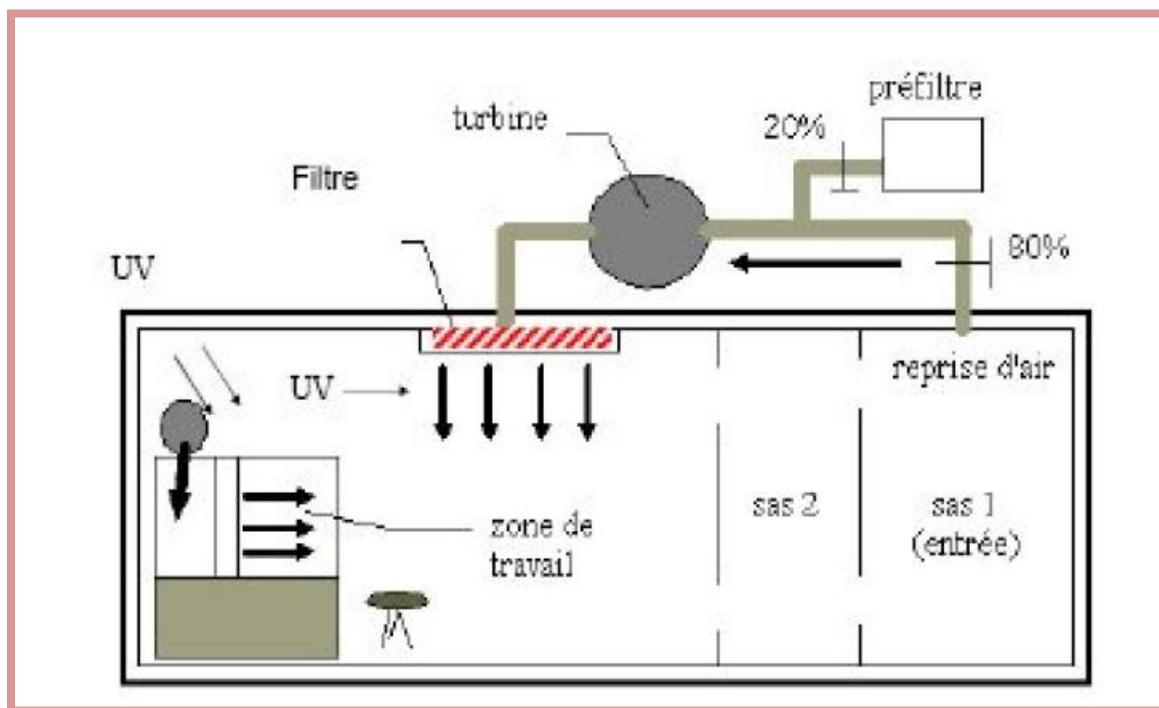


Figure 13 : schéma d'une enceinte stérile [24]

III.2.3.2. Contrôle des enceintes stériles :

Contrôle de : Température, Humidité relative et Pression.

- Contrôle de la stérilité de l'air : milieux nutritifs stériles déposés dans différents endroits de l'enceinte à contrôler, puis culture et comptage bactérien.
- Contrôle de la régularité du flux laminaire (anémomètre)
- Comptage du nombre de particules / m³
- Contrôle des filtres **HEPA** [24]

III.3. Définition les bonnes pratiques de fabrication (BPF) :

Les **BPF** font partie de l'assurance qualité, ces pratiques garantissent que les médicaments sont continuellement produit selon les standards de qualité adéquats, l'usage auquel ils sont destinés, et tels que l'exige l'autorisation officielle de leur mise sur le marché, ils visent à minimiser les risques impliqués dans toute la production pharmaceutique, lesquels ne peuvent être évités qu'en testant le produit fini. [11]

Il s'agit d'un guide qui doit être obligatoirement suivi, qui est organisé en différents chapitres traitant de la gestion de la qualité, du personnel, des locaux et équipements, de la documentation, de la production, du contrôle de qualité, de la sous-traitance et l'analyse de la fabrication, des réclamations et retrait des produits, de l'auto-inspection .

Les **BPF** garantissent que les médicaments sont fabriqués selon des normes de qualité et que leur fabrication est documentée et contrôlée. [10]

III.3.1. Importances des B.P.F :

Les médicaments de mauvaise qualité constituent un risque sanitaire et un gaspillage pour les consommateurs ; ces médicaments peuvent contenir des substances toxiques involontairement ajoutés et présentent ainsi un danger pour la santé publique pour cette raison L'**OMS** a mis en place un système de certification de la qualité des produits pharmaceutiques entrant dans le commerce international, en vue de s'associer à ce système international, de garantir le suivi des exigences liées aux normes internationales selon la qualité, l'efficacité et la sécurité d'emploi et de permettre à nos produits d'être exportés vers d'autre pays. [10]

III.3.2. Bonnes pratiques de fabrication et laboratoire de contrôle :

Les **BPF** sont nécessaire même s'il ya un laboratoire de contrôle, ils ont pour objectifs de diminuer les risques inhérents à toute production

pharmaceutique, qui ne peuvent être entièrement prévenus par l'analyse du produit fini ; Sans les **BPF**, on ne peut être sûr que chaque médicament fabriqué à la même qualité que les autres. [12]

III.3.3. La gestion de la qualité :

III.3.3.1. Définition :

La gestion de la qualité est une fonction interne pour chaque fabricant, le mot «*Gestion* » dans ce contexte fait référence à l'acte ou à l'art de gérer ; il comprend la politique qualité, les systèmes de gestion et les procédures et les technologies de la qualité qui sont employés pour atteindre la qualité nécessaire du produit en maîtrisant les coûts et qui donnent au fabricant confiance dans le fait que la qualité nécessaire au succès sur le marché est bien atteinte et maintenue. La gestion qualité comporte à la fois des aspects contrôle qualité et des aspects assurance de qualité interne. [13]



Figure 14: gestion de la qualité selon la Pharmacopée Helvétique [10]

III.3.3.2. Principe :

Le pharmacien responsable de l'établissement de fabrication doit pouvoir fabriquer des médicaments adaptés à l'emploi, répondant aux exigences du dossier en n'exposant le patient à aucun risque lié à des carences en matière de sécurité, de qualité ou d'efficacité ; Il doit pouvoir assurer que dans une boîte de médicaments, prise au hasard à la sortie de son entreprise le contenu correspond bien à la composition figurant sur l'étiquette alors qu'il ne l'a jamais vue.

III.3.3.3. Aspect contrôle de qualité :

Ils sont décrits ci-après :

a) Concevoir le système qualité en matière d'éléments à y inclure, de technologie qualité à utiliser pour chacun des éléments, des procédures

d'organisation , de compétences et de formation nécessaire , des critères de mesures de la qualité atteinte et de critères des maitrise des couts.

b) Atteindre la qualité nécessaire pour le produit, quantifier les niveaux atteints, mesurer et contrôler les couts de la qualité.

d) Documenter le système de qualité.

e) Documenter la qualité atteinte.

f) Gérer les couts, risques et bénéfices provenant de la conception et le fonctionnement du système qualité.

III.3.3.4. Mise en œuvre de la gestion de la qualité :

La norme gestion de la qualité **ISO 9004**, fournit au fabricant un guide pour des objectifs se rapportant à la fois de contrôle de la qualité et à l'assurance de la qualité interne.

Le guide s'applique à toute les étapes du « *cycle vie* » d'un produit : détermination du besoin ; élaboration des spécifications ; conception du produit ; production ; distribution ou vente ; installation et maintenance ; appréciation de la satisfaction de l'utilisateur. [13]

III.3.4. Assurance qualité :

Dans l'industrie pharmaceutique, on appelle « *Assurance de la qualité* » un ensemble de mesures prises dans la recherche et le développement, le contrôle de la qualité, la production, l'entreposage, la distribution ainsi que l'information destinée aux médecins et aux malades.

Chaque élément de l'assurance de la qualité est indispensable à l'ensemble toute insuffisance ponctuelle aboutit à la mise sur le marché d'un produit défectueux dont l'absorption pourrait avoir des conséquences graves, voire fatales ; Les **BPF** sont à la base de cet ensemble. [29]

III.3.4.1. Objectifs d'assurance qualité :

Les raisons qui conduisent les entreprises à s'investir dans l'assurance qualité sont nombreuses :

● *Qualité sécurité et santé publique :*

Si l'on fixe des standards élevés pour l'assurance de qualité dans la production et la distribution des médicaments, c'est que la qualité est indissolublement liée à la sécurité d'emploi des produits et par conséquent à la santé du malade ainsi que celle de la communauté.

Lorsque l'insuffisance du contrôle a pour conséquence des produits insuffisamment efficaces, ou que leur mauvaise formulation provoque une mauvaise biodisponibilité les chances de guérison des malades en seront évidemment diminuées ; le sous dosage des antibiotiques et d'autres antimicrobiens accélère l'émergence de résistants chez les sujets pathogènes.

● *Qualité et économie :*

L'assurance de la qualité a des conséquences économiques pour les producteurs et pour les acheteurs des médicaments.

L'application des règles des **BPF** est onéreuse, elle aura forcément un effet sur le prix des médicaments.

L'expérience montre toutefois qu'il ya un intérêt économique à appliquer les **BPF** dès le début de la production.

Lorsqu'un ingrédient est mauvais, on gagnerait à s'en apercevoir immédiatement, et à l'écarter plutôt que de le constater plus tard sur une quantité de produits finis, condamné à la destruction. [30]

III.3.4.2. Définition de l'ISO 8402 :

La norme **ISO 8402** définit l'assurance qualité comme un ensemble d'activités pré-établies et systématique mises en œuvre dans le cadre du système qualité et démontrées en tant que besoins pour donner la confiance appropriée. En ce qu'une entité satisfera aux exigences pour la qualité. [30]

III.3.4.3. principes de mise en œuvre :

Les principes sont les suivant :

- Ecrire ce que doit faire.
- Définir qui doit le faire et comment, avec qui?
- Faire ce qui est écrit
- Saisir et corriger les écarts entre ce qui est doit être fait et ce qui est fait.
- Evaluer périodiquement le système pour assurer les corrections des dérives éventuelles.
- Garder trace de l'ensemble selon les besoins d'historique.
- Transmettre et demander l'application de ces règles à ces fournisseurs.

Ces principes traduisent le passage à une culture de l'écrit ; ils sont applicables à tous type d'entreprise et le font progresser vers un produit ou un service plus fiable par rapport aux attentes des clients. [29]

III.3.5. Personnel :

La mise en place et le maintien d'un système d'assurance de la qualité satisfaisant, de même que la qualité de la fabrication des médicaments, reposent sur l'ensemble du personnel. Pour cette raison, le fabricant doit disposer, sur chaque site de fabrication, d'un personnel qualifié et en nombre suffisant pour mener à bien toutes les tâches qui lui incombent.

Les responsabilités individuelles doivent être clairement comprises par les intéressés et mises par écrit. Tous les membres du personnel doivent être conscients des principes de **BPF** qui les concernent ; il convient d'assurer leur formation initiale et continue et notamment de donner les instructions d'hygiène en rapport avec l'activité exercée. [14]

III.3.5.1. Les postes clés :

Les postes clés comprennent les postes de pharmacien responsable, de chef du département de production et de chef du département du contrôle de la qualité. Les postes clés doivent normalement être occupés par du personnel travaillant à plein temps. Les chefs des départements de production et de contrôle de la qualité doivent être indépendants l'un de l'autre.

Au sein de grandes entreprises. [15]

III.3.5.2. Formation du personnel :

La formation c'est une nécessité absolue pour une entreprise moderne, en l'occurrence pharmaceutique, en raison de l'évolution rapide des techniques mais aussi dans le but d'avoir des employés créatifs, imaginatifs et surtout critiques ; Selon le guide des **BPF** , le personnel doit recevoir, initialement puis de façon répétée, une formation, dont l'efficacité est vérifiée.

Les programmes de formation doivent être disponibles et approuvés, selon le cas, soit par le chef de production, soit par le chef du contrôle de la qualité. Les procès-verbaux des séances de formation doivent être conservés. [16]

III.3.5.3. Hygiène du personnel :

Des programmes détaillés consacrés à l'hygiène doivent être établis et adaptés aux différents besoins de l'entreprise ; Ils doivent comporter des procédures relatives à la santé, à l'hygiène et à l'habillement du personnel.

Les procédures doivent être comprises et observées de façon stricte par toute personne appelée à pénétrer dans les zones de fabrication et de contrôle. Les programmes d'hygiène doivent être promus par la direction et discutés de façon approfondie au cours de séances de formation. [17]



Figure 15: Vêtement de protection pour la fabrication aseptique (Classe B) [23]

III.3.6. Moyens matériels nécessaires aux opérations de fabrication :

Les locaux et le matériel doivent être situés, conçus, construits, adaptés et entretenus de façon à convenir au mieux aux opérations à effectuer.

Leur plan, leur conception et leur utilisation doivent tendre à minimiser les risques d'erreurs et à permettre un nettoyage et un entretien efficaces en vue d'éviter les contaminations ; Les locaux et le matériel destinés à être utilisés dans les opérations de fabrication critiques pour la qualité des produits sont soumis à une qualification appropriée.

III.3.6.1. Locaux :

Les locaux doivent être situés dans un environnement qui, tenant compte des mesures prises pour protéger la fabrication, ne présente pas de risque de contamination pour les produits, doivent être nettoyés et désinfectés selon des procédures écrites détaillées, l'éclairage, la température, l'humidité et la ventilation doivent être appropriés afin de ne pas affecter, directement ou indirectement, ni les médicaments durant leur fabrication et leur stockage, ni le bon fonctionnement du matériel ; Doivent être conçus, construits, équipés et entretenus en vue d'empêcher au mieux l'entrée d'insectes et d'autres animaux. Des mesures doivent être prises en vue d'empêcher l'entrée de personnes non autorisées. [18]

III.3.6.2. Équipements nécessaires à la préparation de médicaments stériles :

A. Zone d'atmosphère contrôlée ZAC :

Les zones à atmosphère contrôlée (**ZAC**) sont des locaux dans lesquels le niveau de propreté est contrôlé et la contamination microbienne et particulaire est définie. ; Les **ZAC** sont construites de manière à minimiser le nombre de substances contaminantes. L'accès se fait par plusieurs sas (pour le personnel, pour le matériel, pour les substances).

Il existe différentes classes, selon le niveau de propreté dans chacune d'entre elles :

- Classe A :** opération à haut risque (flux laminaire)
- Classe B :** préparation et remplissage aseptique (enceinte stérile)
- Classe C et D :** destinée aux étapes moins critiques de la fabrication des médicaments stérile.

- Différents paramètres sont régulés, tels que le taux de renouvellement de l'air, le nombre de particules et de micro-organismes admis, la pression relative, la température, l'humidité relative.

Le tableau ci-dessous représente (**Tableau 4**) les limites de contamination microbienne dans les différentes **ZAC**, selon les **BPF**.

Tableau 4 : limites recommandées de contamination microbiologique des surfaces suivant les BPF et les BPP (a) [22]

Classe	boîte de Pétri (diamètre 90 mm) ufc/4 heures (b)	géloses de contact (diamètre 55mm) ufc/plaque	empreintes de gant (5doigts) ufc/gant
A	< 1	< 1	< 1
B	5	5	5
C	50	25	-
D	100	50	-

- (b) certaines boîtes de Pétri peuvent être exposées pendant moins de 4 heures

- Les principes de fonctionnement prévus dans les **BPP** reprennent ceux déjà décrits dans les **BPF**.

- **schéma aéraulique**

Trois facteurs essentiels contribuent à l'obtention d'une zone d'atmosphère contrôlée. Il s'agit du nombre de renouvellements d'air, du système de traitement d'air et des écarts de pression entre les zones de classes différentes.

Dans tous les cas, le schéma aéraulique de ces zones doit éviter que la circulation de l'air n'entraîne les particules provenant d'une personne, d'une opération ou d'une machine, vers une zone de plus haut risque pour la préparation. Le système de traitement d'air doit être muni de filtres appropriés, tels que les filtres à haute efficacité vis-à-vis des particules de l'air (**HEPA**) (*High Efficiency Particulate Air filter*).

Ces systèmes de filtration doivent en plus être conçus pour que la totalité des effluents gazeux soit rejetée à l'extérieur de la pièce.

Outre le nombre de renouvellement d'air et les filtres **HEPA**, la zone de classe **A** doit être alimentée par un système de flux d'air laminaire dont l'air circulant est délivré au niveau du poste de travail. [20] (**Figure 16**)

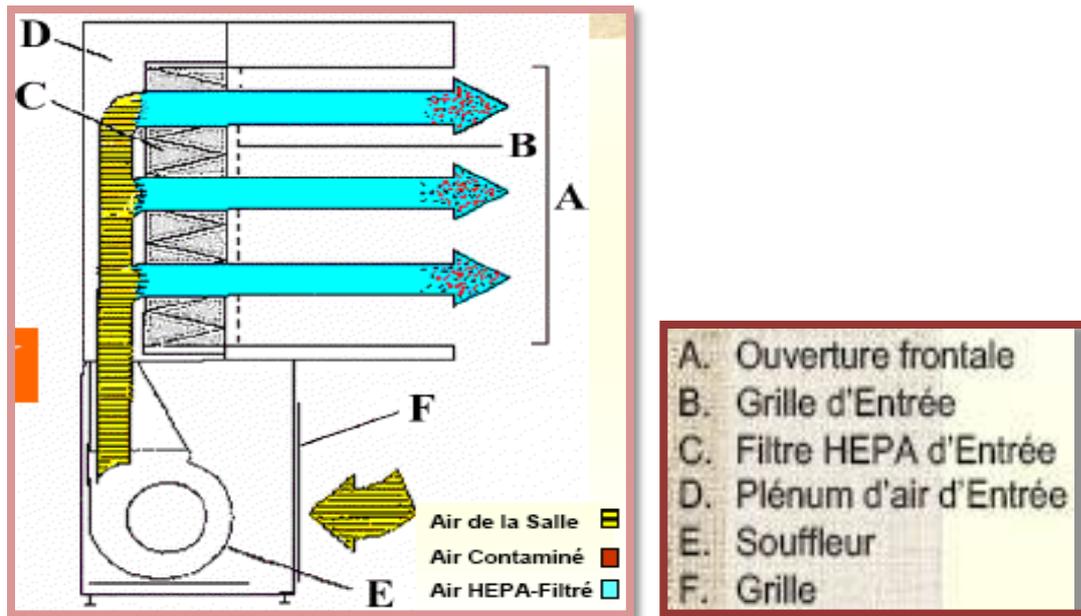


Figure 16 : Flux d'air laminaire horizontal [21]

- Les flux d'air laminaire horizontaux assurent la protection du produit en empêchant la contamination par le manipulateur ou l'environnement.
 - En effet, l'air sort de la hotte en repoussant les éventuels contaminants externes. Les flux d'air laminaire verticaux assurent quant à eux la protection du produit, ainsi que celle du manipulateur, car l'air ne ressort pas de la hotte directement sur celui-ci. [20]
 - Dans les flux d'air laminaire vertical, le filtre **HEPA** se trouve en haut de la hotte et l'air circule de manière verticale, c'est-à-dire du haut vers le bas.
 - L'air « propre » qui arrive perpendiculairement sur le plan de travail, est ensuite aspiré par des perforations se trouvant au niveau de l'ouverture frontale, ceci créant une barrière empêchant l'air extérieur d'entrer dans la hotte, et empêchant l'air filtré, à l'intérieur de la hotte, d'en sortir.
 - Cet air ne ressort donc pas directement dans la salle environnante mais est d'abord filtré à nouveau.
 - L'ouverture frontale est également protégée par une vitre.
- (Figures 17 et 18)**

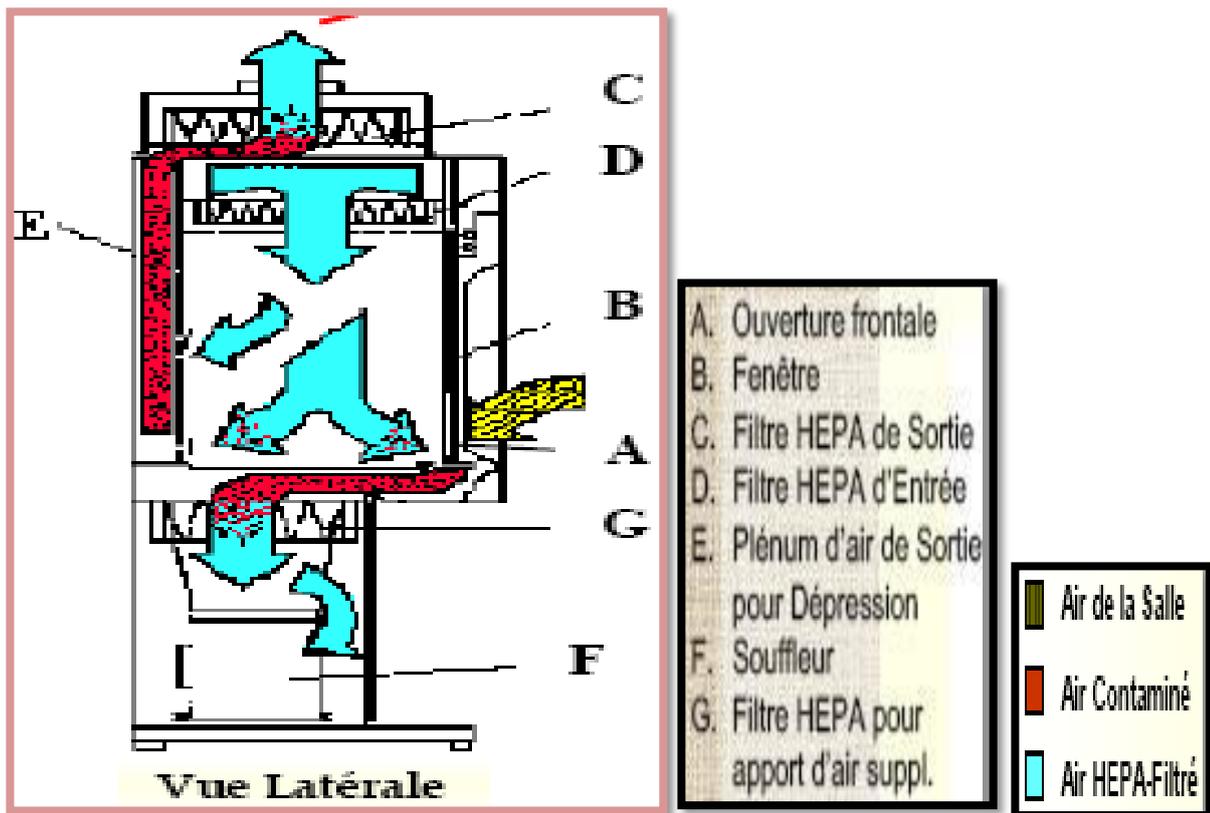


Figure 17 : Flux d'air laminaire vertical [21]



Figure 18: Manipulateur sous flux d'air laminaire vertical [21]

- **Sas d'accès**

L'accès à ces zones se fait par des sas réservés au personnel et/ou au matériel et aux substances, afin de préserver les qualités particulière et microbiologique de leur environnement.

Les différentes portes d'un sas ne peuvent être ouvertes en même temps ; pour se faire, un système de blocage alterné ou une alerte visuelle ou sonore doit être utilisé.

Les vestiaires du personnel de fabrication doivent être conçus et utilisés comme des sas en vue de fractionner physiquement les différentes phases de l'habillage et de diminuer ainsi la contamination microbienne et particulaire des vêtements protecteurs.

Ils sont efficacement ventilés avec de l'air filtré.

Les lave-mains doivent être installés, dans la mesure du possible, dans la première partie du vestiaire. [23]



- **Alimentation et évacuation des eaux**

Selon les **BPF**, les équipements d'alimentation et d'évacuation d'eau, les éviers et les canalisations doivent être exclus des zones de classe **A/B** utilisées pour des fabrications aseptiques. Dans les autres zones, des systèmes anti-retour doivent être installés entre les machines ou les éviers et les canalisations.

Les évacuations au sol des zones d'atmosphère contrôlée de classe inférieure doivent être équipées de siphons ou de gardes d'eau pour éviter tout reflux ; L'eau destinée aux préparations injectables doit être produite, stockée et distribuée de façon à inhiber la croissance de micro-organismes ; l'inhibition de la croissance de micro-organismes peut être obtenue par une circulation constante de l'eau à une température supérieure à **70°C**. [21]

B. Dispositifs séparatifs :

- *Les isolateurs*

Les isolateurs et les dispositifs de transfert permettent de diminuer les interventions humaines et donc l'exposition à l'environnement.

Ils permettent ainsi de réduire sensiblement le risque de contamination microbiologique des produits fabriqués de façon aseptique.

L'isolateur est un équipement clos, à paroi souple ou rigide, qui permet de créer une barrière physique étanche entre la préparation, le manipulateur et l'environnement adjacent pour éviter la contamination des produits stériles.

Afin de minimiser les risques de contaminations microbiologiques, les entrées et les sorties de l'isolateur se font soit à l'aide de dispositifs de transfert étanches soit à l'aide d'un sas de transfert conçu pour assurer une stérilisation chimique (par : l'acide peracétique ou peroxyde d'hydrogène) du matériel entrant. [21]



Figure19 : Isolateur stérisafe pour les opérations aseptiques

Afin de tester l'asepsie des préparations obtenues, le médicament est remplacé par un milieu de culture à l'hydrolysate de caséine et de soja

III.3.7. Documentation :

Une bonne documentation constitue un élément essentiel des **BPF**.

Le fabricant doit disposer de documents pré-établis relatifs aux opérations et aux conditions générales de fabrication de chaque lot. Cet ensemble de documents doit permettre de retracer l'historique de chaque lot fabriqué et des modifications apportées au cours de la mise au point d'un médicament expérimental.

Doivent être agréés, signés et datés par les personnes compétentes autorisées, ne peuvent être ambigus : le titre, la nature et l'objet doivent être clairement indiqués. Ils doivent être présentés de façon ordonnée et être faciles à vérifier, clairs et lisibles. [14]

Les documents relatifs à un lot de médicaments doivent être conservés au moins un an après la date de péremption du lot concerné et au moins cinq ans après la libération du lot. [24]

III.3.8. La production :

La production doit être effectuée selon des procédures écrites détaillées. Elle regroupe les différentes étapes et processus de préparation, de la réception des matières premières à l'obtention du produit fini, y compris le conditionnement des médicaments. Des mesures sont exigées quant à la prévention des contaminations croisées, à la validation des procédures, du matériel, de l'équipement et des locaux, aux spécifications des matières premières et à leur libération, aux opérations de fabrication, aux articles et opérations de conditionnement, ainsi qu'aux produits et articles refusés, récupérés et retournés. [12]

III.3.9. Le contrôle de la qualité :

Le contrôle de la qualité a pour but de certifier que chaque produit satisfait aux exigences de qualité. Il doit être effectué sur les équipements et les opérations, garantir un contrôle analytique des matières premières, ainsi qu'un échantillonnage caractéristique de chaque lot ; De plus, il doit comporter des comptes rendus sur les essais permettant la libération de chaque lot. Ceux-ci doivent être conservés au moins un an après la date limite d'utilisation des matières premières et au moins un an après la date de péremption des produits finis. [28]

III.3.10. Fabrication et analyse sous-traitance :

Toute opération de fabrication, ou liée à la fabrication et l'analyse réalisées en sous-traitance doivent être convenablement précisées, convenues et contrôlées en vue d'éviter tout malentendu susceptible de conduire à un travail ou à un produit de qualité insuffisante. [27]

Un contrat écrit doit être établi entre le donneur d'ordre et le sous-traitant en vue de fixer clairement les obligations de chaque partie, notamment le respect des principes et lignes directrices des **BPF** par le sous-traitant.

Le contrat doit préciser la façon selon laquelle le pharmacien responsable libérant chaque lot de produit destiné à la vente, exerce sa pleine responsabilité. Le sous-traitant ne doit pas lui-même sous-traiter tout ou partie du travail confié par contrat par le donneur d'ordre sans y avoir été autorisé par écrit par celui-ci. [1]

III.3.11. Auto-inspection:

L'auto-inspection fait partie du système d'assurance de la qualité et doit être réalisée de façon répétée en vue de contrôler la mise en œuvre et le respect des **BPF** et de proposer les mesures correctives nécessaires.

L'auto-inspection et toute mesure corrective subséquente doivent faire l'objet de comptes rendus. [29]

III.4. Efficacité de la conservation antimicrobienne :

Dans le cas où les préparations pharmaceutiques elles-mêmes ne possèdent pas de propriétés antimicrobiennes adéquates, des agents de conservation antimicrobienne peuvent être ajoutés, spécialement aux préparations aqueuses, pour éviter la prolifération ou limiter la contamination microbienne qui, dans les conditions normales de conservation et d'emploi, notamment pour des récipients multidoses, pourrait se produire et entraîner un risque d'infection pour le malade et une détérioration de la préparation.

L'activité antimicrobienne de la préparation dans son récipient définitif est évaluée pour sa durée de validité, afin de s'assurer que cette activité ne se modifie pas au cours de la période de conservation. [36]

L'efficacité de l'activité antimicrobienne peut être démontrée à l'aide de l'essai décrit ci-dessous. L'essai n'est pas destiné au contrôle de routine.

III.4.1. Essai de l'efficacité de la conservation antimicrobienne :

L'essai consiste en la contamination artificielle de la préparation, si possible dans son récipient définitif, au moyen d'un inoculum de micro-organismes appropriés prescrit, au maintien de la préparation inoculée à une température prescrite, au prélèvement d'échantillons à partir du récipient à intervalles de temps donnés et au dénombrement des organismes dans les échantillons ainsi prélevés.

Les propriétés de conservation de la préparation sont adéquates si, dans les conditions de l'essai, une diminution importante ou, selon le cas, l'absence

d'augmentation du nombre de micro-organismes dans la préparation ensemencée se produit après les temps et aux températures prescrits.

Les critères d'acceptation, en terme de diminution du nombre de micro-organismes en fonction du temps, varient pour les diverses catégories de préparations, selon le degré de protection recherché.

Microorganismes d'essai [36]

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 82.118.	ATCC 9027 ; NCIMB 8626 ;
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 ; NCTC 10788 ; NCIMB 9518 ; CIP 4.83.
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 ; NCPF 3179 ; IP 48.72.
<i>Aspergillus niger</i> IP 1431.83.	ATCC 16404 ; IMI 149007 ;

III.4.2. Procédé :

Pour le dénombrement des micro-organismes viables dans les préparations ensemencées, utilisez le même milieu gélosé que celui employé dans la culture initiale du micro-organisme correspondant.

Ensemencez une série de récipients du produit à examiner avec une suspension de l'un des micro-organismes d'essais afin d'obtenir un inoculum de 10^5 à 10^6 micro-organismes /ml ou / g de préparation.

Le volume de la suspension de l'inoculum ne dépasse pas 1 pour cent du volume du produit ; Mélangez soigneusement pour assurer une répartition homogène, après incubation à une température de 20-25 °C à l'abri de la lumière. Prélevez des échantillons appropriés de chaque récipient, par exemple 1 ml ou 1 g, au temps zéro et aux intervalles appropriés, selon le type de préparation, et déterminez le nombre de micro-organismes viables par dénombrement sur plaques ou par filtration sur membrane ; en vérifiant que toute activité antimicrobienne résiduelle dans la préparation est éliminée par dilution, par filtration ou par l'utilisation d'un neutralisant spécifique.

La méthode est validée afin de vérifier sa capacité à mettre en évidence la réduction requise du nombre de micro-organismes viables. [47]

III.4.3. Critères d'acceptation :

Les critères pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne sont donnés dans les tableaux (5, 6 et 7) en termes de réduction logarithmique du nombre de micro-organismes viables par rapport à la valeur obtenue pour l'inoculum.

Tableau 5 – Préparations parentérales et Ophtalmiques. [36]

	Réduction logarithmique					
		6h	24h	7j	14j	28j
Bactéries	A	2	3	-	-	NR
	B	-	1	3	-	NI
Champignons	A	-	-	2	-	NI
	B	-	-	-	1	NI

- (NR : non retrouvé)
- (NI : pas d'augmentation)
- Les critères A représentent l'efficacité qu'il est recommandé d'atteindre.
- Dans des cas justifiés, lorsque les critères A ne peuvent être respectés, par exemple en raison d'une augmentation du risque de réactions indésirables, les critères B s'appliquent.

Tableau 6 – Préparations pour application locale. [36]

	Réduction logarithmique				
		2j	7j	14j	28j
Bactéries	A	2	3	-	NI
	B	-	-	3	NI
Champignons	A	-	-	2	NI
	B	-	-	1	NI

Tableau 7 – Préparations orales [36]

	Réduction logarithmique		
		14j	28j
Bactéries	A	-	NI
	B	3	NI
Champignons	A	2	NI
	B	1	NI

CHAPITRE IV



*Contrôle
qualité*

Introduction :

- Les contrôles font partie des **BPP**. Ils garantissent que les analyses nécessaires et appropriées ont réellement été effectuées et que toutes les matières premières, tous les articles de conditionnement et toutes les préparations sont libérés pour l'utilisation dès lors que leur qualité a été jugée satisfaisante.

- L'activité de contrôle est indépendante de l'activité de préparation, pour autant que les effectifs de la structure le permettent. Les contrôles sont placés sous l'autorité d'une personne possédant des qualifications requises et une expérience suffisante.

Des moyens suffisants en personnel, en matériel et locaux sont disponibles afin que soit garantie la mise en œuvre efficace et fiable ; Dans la mesure du possible, les contrôles sont effectués par une personne différente de celle ayant préparé le produit dont les résultats font l'objet de comptes-rendus datés et signés, sont de différents types, notamment :

- des contrôles physico-chimiques pour les matières premières (en considérant sa source et ses conditions d'échantillonnage et pour les préparations terminées soumises à échantillothèque.

- des contrôles microbiologiques mentionnés par la pharmacopée Pour les formes stériles.

IV.1. Contrôles biologiques de routine appliqués aux médicaments injectables et aux dispositifs médicaux stériles et apyrogènes:

La stérilité et l'apyrogénicité, définies comme les absences respectives de micro-organismes viables et de substances pyrogènes, constituent des critères de qualité microbiologique et de sécurité pour l'administration des médicaments ou l'utilisation des dispositifs médicaux chez l'homme.

- Le contrôle de ces paramètres, en termes d'objectif, de conditions opératoires et d'interprétation des résultats, est fixé par les réglementations ou normalisations européennes et américaines pharmacopée pour les médicaments et normes pour les dispositifs médicaux. [40]

IV.1.1. Contrôle de la stérilité des dispositifs médicaux :

La méthodologie de l'essai de stérilité applicable aux dispositifs médicaux est décrite dans la norme **NF EN ISO 11737-2** relative aux essais pratiqués en cours de validation d'un procédé de stérilisation.

La norme **NF EN ISO 14937**, relative aux « exigences générales pour la caractérisation d'un agent stérilisant et pour le développement, la validation, et la vérification de routine d'un processus de stérilisation pour dispositifs médicaux » définit en effet l'essai de stérilité comme un « essai effectué dans le cadre de la mise au point, visant à déterminer la présence ou l'absence de micro-organismes viables sur des unités de produits (ou des portions d'unités de ces produits) ». [42]

IV.1.2. Contrôle de la stérilité des préparations pharmaceutiques :

Pour les préparations pharmaceutiques telles que les solutions parentérales, injectées dans le système sanguin ou sous la peau, les pharmacopées internationales demandent une stérilité complète.

Ces produits stériles doivent être libérés sur la base d'un contrôle de qualité microbiologique incluant un test de stérilité sur chacun des lots.

Les textes normatifs décrivent précisément les procédures à mettre en place au sein du laboratoire de contrôle qualité pour prouver que le produit est stérile avant sa libération.

L'objectif du contrôle de stérilité des injectables est de vérifier l'absence de micro-organismes dans un échantillon représentatif d'un lot de médicaments.

La méthode culturale est la méthode de référence utilisée depuis quelques dizaines d'années ; Elle présente l'inconvénient d'un résultat différé rendant la libération d'un lot impossible avant **14 jours** après production. [40]

Cependant des méthodes alternatives rapides ou directes sont aujourd'hui disponibles. Parmi elles, la cytométrie en phase solide (*ChemScan RDI*) associée à la technologie de marquage fluorescent des micro-organismes viables présente l'intérêt majeur d'un résultat en quelques heures pour une sensibilité extrême jusqu'à **1** micro-organisme par unité de volume testé.

Ainsi le stockage des produits dans l'attente des résultats microbiologiques peut être réduit de **14 jours** à moins de **24** heures avec une réduction très significative des coûts de stockage. De plus, le marquage fluorescent utilisé n'est pas spécifique de telle ou telle espèce microbienne et permet la détection de l'ensemble des micro-organismes, bactéries, levures, moisissures, que ce soit sous forme végétative ou sous forme de spore, que l'organisme soit aérobie ou anaérobie. Le marquage reposant sur une

activité enzymatique et l'intégrité membranaire, seuls les micro-organismes viables sont marqués et détectés. [41]

IV.1.2.1. Intérêt relatif de l'essai de stérilité:

L'intérêt du contrôle de stérilité dépend du mode d'obtention des produit stériles ; Il existe trois stratégie de préparations de ces médicaments ; La plus courante est réalisée en première intention c'est la stérilisation dans le conditionnement définitif ou encore stérilisation terminale. Dans ce cas, le principe actif, les excipients et le récipient ne sont pas obligatoirement stériles mais d'un niveau de contamination le plus bas possible, lorsque la stérilisation terminale n'est pas envisageable (produit hygro- ou thermosensible), il est possible de réaliser une filtration stérilisante, la répartition se faisant dans un récipient stérile en zone d'atmosphère contrôlée ; les matières premières ne sont pas nécessairement stériles. [44]

Lorsque le produit n'est pas filtrable, la troisième solution consiste en une préparation aseptique qui nécessite une stérilité des matières premières, des récipients et de la zone de conditionnement. [40]

IV.1.2.2. Limites de l'essai de stérilité:

Le résultat favorable d'un essai de stérilité signifie seulement qu'aucun micro-organisme contaminant n'a pu être décelé dans l'échantillon examiné dans les conditions de l'essai. L'extension du résultat à l'ensemble du lot est fonction de l'homogénéité du lot, de la validation du procédé de fabrication et du plan d'échantillonnage adopté.

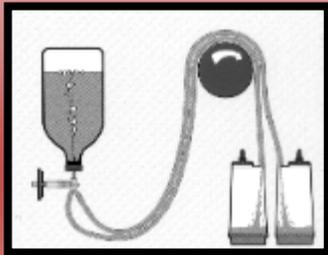
Pour des raisons statistiques qui définissent le **NAS** comme la probabilité d'existence d'un produit non stérile dans une population de 10^6 produits, l'essai de stérilité ne peut à lui seul apporter la preuve formelle de la stérilité d'un lot de produit. Il reste en revanche le seul moyen analytique à la disposition des instances pour effectuer des contrôles. [45]

IV.1.2.3. Matériel nécessaire :

➤ Appareillage nécessaires :

- Une hotte à flux laminaire ou un isolateur stérilisable par un gaz (acide peracétique ou peroxyde d'hydrogène) associé à un appareil pour la vaporisation de l'agent stérilisant ;

- Une rampe de filtration avec des unités de filtration ou un système composé d'un appareil et d'unités de filtration en vase clos ;
- Dans tous les cas, une pompe à vide.



Système fermé



Système ouvert

Figure 23 : Appareil d'unité de filtration [40]

➤ **Réactifs et milieux de culture nécessaires :**

- Des membranes stériles en cellulose (nitrate pour les solutions aqueuses, huileuses ou faiblement alcooliques et sous forme d'acétate pour les solutions fortement alcooliques de **50 mm** de diamètre et de **0,45 µm** de diamètre de pores ;
- Un diluant stérile adapté pour les rinçages des membranes ;
- Des flacons de bouillon au thioglycolate et de bouillon trypticase-soja
- Un agent stérilisant : acide peracétique ou peroxyde d'hydrogène pour le fonctionnement en isolateur

IV.1.1.2.5. Échantillonnage :

La Pharmacopée européenne donne des règles d'échantillonnage en fonction de la taille du lot et du volume ou de la quantité par récipient de la préparation testée.

- La taille de l'échantillon représentatif est variable selon le type de préparation. Il faut noter que pour les petits lots de préparations parentérales, un minimum de 4 unités est nécessaire. Il est donc impossible de conclure sur la base d'un essai de stérilité réalisé sur un seul récipient.

-La quantité de produit à analyser par unité dépend principalement du type de produit (liquide, solide ou pâteux) et du volume ou de la quantité contenus dans le récipient

En général, la totalité des récipients est à analyser pour les volumes inférieurs à **1 ml** et les masses inférieures à **50 mg**.

Au-delà de ces valeurs, seule une partie du contenu des récipients est à prélever, de l'ordre de **20 ml** pour les liquides et au maximum **500 mg** pour les poudres. [46]

IV.1.2.5. Méthodologies :

La recherche de micro-organismes proposée par la pharmacopée est basée sur la mise en culture en milieu liquide soit de l'échantillon lui-même (**ensemencement direct**), soit d'une membrane sur laquelle les micro-organismes ont été recueillis par filtration préalable du produit (**filtration sur membrane**). La présence d'un éventuel micro-organisme se matérialise par l'apparition, après incubation à une température et pendant une durée déterminées, d'un trouble du milieu de culture lié à sa multiplication, confirmé par comparaison avec un témoin négatif.

▪ *Filtration sur membrane*

La priorité est donnée à cette technique toutes les fois que le produit à analyser le permet. C'est le cas de nombreuses formes pharmaceutiques liquides puisque peuvent être filtrées à la fois des solutions aqueuses, des solutions alcooliques mais également des solutions huileuses.

Certaines préparations plus visqueuses peuvent être diluées de façon appropriée avant filtration. Les lyophilisats peuvent également être filtrés après reconstitution aseptique avec un diluant stérile adapté.

Cette méthode est plus sensible que l'ensemencement direct car les volumes filtrés peuvent être importants alors que dans la première technique, on ne peut introduire qu'un volume limité de produit.

En plus de sa sensibilité, la filtration permet, par la possibilité du rinçage qui élimine toute trace de produit analysé ; Le volume de rinçage doit être validé et il est conditionné par le volume de produit à filtrer, sachant que, selon la pharmacopée, une membrane supporte au total le passage d'un litre de liquide maximum, réparti en **5** filtrations de **200 ml**.

La filtration du produit à analyser est suivie, si besoin de trois rinçages de la membrane par un diluant stérile approprié [40]

- ***Ensemencement direct***

Cette technique a l'avantage d'être simple à réaliser puisqu'elle ne nécessite pas de traitement préalable de l'échantillon ni de matériel particulier. L'exigence principale concerne le volume maximal de produit pouvant être ensemencé correspondant à **10 %** maximum du volume total de milieu. Ce procédé est à réserver en pratique à des produits non filtrables. **[48]**

- ***Essai de stérilité proprement dit***

Pendant toute la durée de la manipulation, des témoins négatifs constitués de flacons ouverts de milieux de culture sont présents à proximité. Ils servent à détecter la présence d'éventuelle de micro-organismes dans l'atmosphère du lieu de travail. Ils remettent en cause le caractère valable de l'essai lorsqu'un trouble est observé simultanément sur les bouillons et les témoins. Ces flacons témoins sont incubés au même titre que les essais sur les produits pendant une période de **14 jours**. **[40]**

- **Tests de validation**

Les résultats de l'essai de stérilité sur produit ne sont interprétables qu'à condition que des validations préalables aient été effectuées. Ces validations concernent les milieux de culture en eux-mêmes et les milieux de culture en présence des produits, des tests de fertilité et de stérilité permettent de prévenir respectivement les faux négatifs et les faux positifs lors des contrôles effectués en routine. **[43]**

Pour tous les essais de validation, la Pharmacopée propose un certain nombre de souches de référence (**Tableau 8**).

Tableau 8 – Micro-organismes d'essai recommandés par la Pharmacopée européenne [49]

Milieu	Micro-organismes	Incubation
	Espèces	Température (°C) et durée maximale
<i>Milieu liquide thioglycolate</i>	Bactéries aérobies	32,5 (± 2,5) 3 jours maximum
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Bactéries anaérobies	
	<i>Clostridium sporogenes</i>	
<i>Hydrolysate de caséine de soja</i>	Levures et moisissures	22,5 (± 2,5) 5 jours maximum
	<i>Candida albicans</i>	
	<i>Aspergillus niger</i>	
	Bactérie aérobies	
	<i>Bacillus subtilis</i>	

IV.1.2.6. Interprétation des résultats :

L'interprétation des résultats est très précisément décrite par la pharmacopée européenne qui, suite à l'amélioration de la qualité de

l'environnement et des techniques de contrôles de stérilité, propose une stratégie très stricte.

Lors de l'apparition d'un trouble, par comparaison avec le témoin négatif, trois éléments sont à mettre en place :

- Un repiquage sur milieu frais,
- Une identification des éventuels micro-organismes,
- La préparation d'un éventuel deuxième essai. [50]

Le repiquage, qui consiste, après incubation, à prélever de façon aseptique dans le flacon un petit volume de milieu et à le réinjecter dans un autre flacon de milieu frais, sert à distinguer la nature du trouble qui peut être chimique ou microbiologique :

➤ En cas de trouble chimique, lié à la nature du médicament, la dilution dans le nouveau milieu fait disparaître ce trouble, en cas de trouble microbien, la multiplication des germes introduits dans le milieu frais reproduit le trouble observé dans le flacon initial.

➤ Seuls deux essais sont possibles et le deuxième essai ne peut être lancé que si un certain nombre d'hypothèses ont été éliminées.

- La Pharmacopée distingue deux notions distinctes :
 - la notion d'essai valable ou non,
 - et la notion de produit satisfaisant ou pas à l'essai.

➤ Deux cas peuvent se présenter :

a. Absence de croissance microbienne le produit satisfait à l'essai.

b. En cas de croissance microbienne avérée (trouble de nature microbiologique), un certain nombre de points sont à prendre en compte résultats des contrôles microbiologiques d'environnement, défaut d'asepsie lors de la manipulation, pousse des témoins négatifs, nature des micro-organismes isolés.

➤ Si en réponse à ces questions, toute hypothèse de contamination extérieure est éliminée, alors le trouble observé est attribué à la non-stérilité de l'échantillon aucun essai supplémentaire n'est autorisé, le produit est déclaré « ne satisfaisant pas à l'essai » donc l'essai est déclaré « non valable ».

➤ Dans la mesure où les conditions de sa réalisation n'ont pas été jugées conformes, un deuxième essai est autorisé. Par la suite, le produit satisfait ou non à l'essai, selon les mêmes règles. [50]

IV.2. L'Apyrogénicité :

Un produit est dit apyrogène lorsqu'il n'engendre pas d'augmentation de température interne chez un animal à sang chaud ou chez l'humain in vivo.

- la stérilisation à l'autoclavage est insuffisante, en ce sens que des bactéries détruites peuvent subsister et larguer des endotoxines.
- les produits apyrogènes sont demandés par les utilisateurs dans différents domaines, en particulier dans la culture de cellules et de tissus.

En effet les substances pyrogènes peuvent avoir un effet cytotoxique.

- la méthode utilisée pour tester et certifier la non pyrogénicité des produits est le test **LAL (limulus Amebocyte lysat)** avec un taux maximum de **0,5 Unité d'Endotoxines/ml** (norme admise par la **FDA**). [41]

IV.2.1. Définition des endotoxines bactériennes :

Les endotoxines sont des complexes macromoléculaires toxiques présents de manière constitutive dans la membrane externe de toute bactérie à Gram négatif.

Les termes « endotoxine » et « lipopolysaccharide » sont souvent indifféremment utilisés dans la littérature scientifique.

Cependant le terme « lipopolysaccharide » devrait être réservé pour désigner des substances chimiques pures, libres de tout autre composé chimique présent dans la membrane des bactéries à Gram négatif.

C'est une substance thermostable biologiquement active. [51]

La détection d'endotoxines témoigne de la présence antérieure de bactéries ; Ils sont responsables de chocs févrioux si elles sont injectées directement dans le sang. [46]

IV.2.2. Localisation des endotoxines:

Les lipopolysaccharides (**LPS**) constituent la couche la plus externe de la membrane externe des bactéries à Gram négatif ; La paroi des bactéries à Gram négatif est constituée de trois couches :

- Une membrane **interne** ou **cytoplasmique** qui sert de barrière osmotique ;
- Une membrane **intermédiaire**, à base de peptidoglycanes, qui maintient l'intégrité de la structure et la forme caractéristique de la bactérie ;

- Une membrane **externe** contenant les lipopolysaccharides, identifiés dans toutes les bactéries Gram négatif étudiées, responsable d'une partie de l'activité biologique. [52]

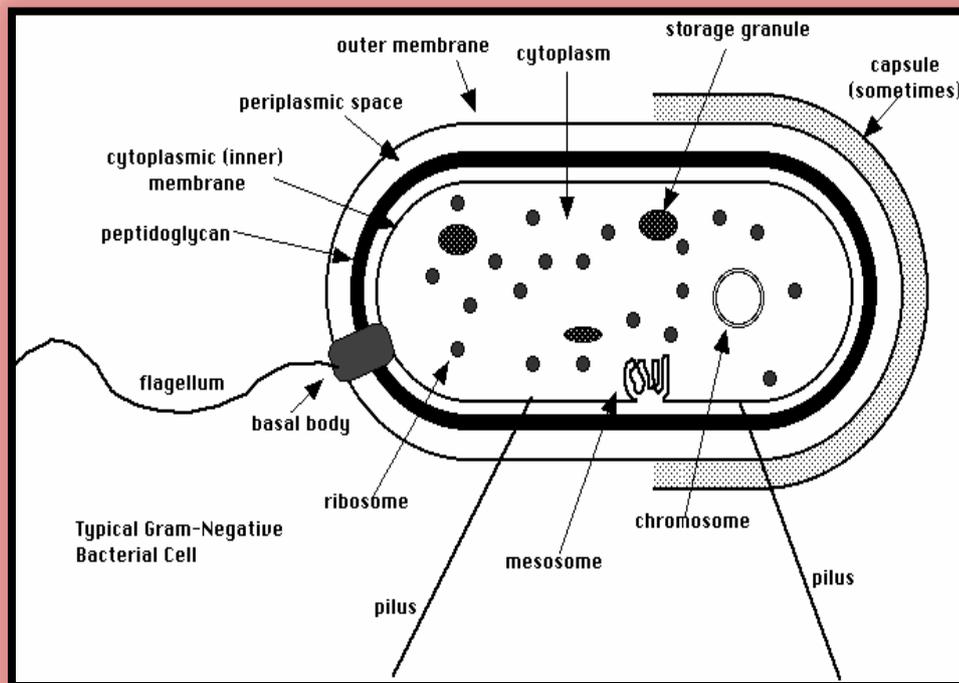


Figure 24 : Bactérie à Gram négatif [52]

IV.2.3. Structure des endotoxines :

Les endotoxines sont donc constituées d'un fragment de paroi de bactérie Gram négatif et du lipopolysaccharide (**LPS**) ; Le **LPS** n'est pas une molécule unique mais une famille de composés ; chaque genre et chaque espèce de bactéries produit un **LPS** spécifique.

Les **LPS**, parties biologiquement actives des endotoxines, sont eux-mêmes constitués de deux parties :

- Une partie polysaccharidique, fabriquée à partir d'un noyau oligosaccharidique, le « core » ou base, et d'une chaîne O spécifique ;
- Une partie phospholipidique, le lipide A, siège de l'activité pro- inflammatoire. [53]

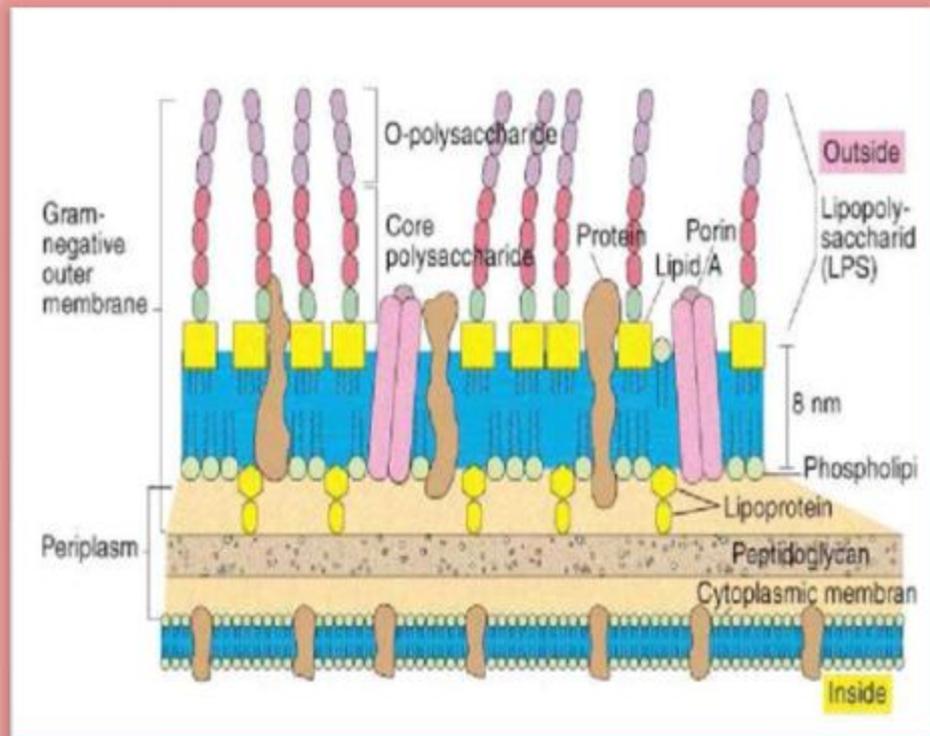


Figure 25 : Paroi de bactéries à Gram négatif [52]

IV.2.4. Propriétés biologiques:

Le **LPS** est un complexe macromoléculaire comportant une portion lipidique liée de façon covalente à une partie polysaccharidique est responsable de la majorité des effets biologiques liés à l'infection par les germes à Gram négatif.

La composante glucolipidique constante du **LPS**, le lipide A, est le support des propriétés endotoxiques thermostables.

La spécificité sérologique réside dans la portion polysaccharidique variable qui correspond à l'antigène somatique O des bactéries à Gram négatif. [52]

IV.2.5. Propriétés immunologiques:

IV.2.5.1. La spécificité sérologique :

Cette spécificité réside dans la portion polysaccharidique variable du **LPS** qui correspond à l'antigène somatique O des souches lisses ou à la partie externe du core oligosaccharide des souches R.

L'injection de bactéries à Gram négatif ou de **LPS** à un animal induit la production d'anticorps dirigés contre les déterminants polysaccharidiques.

L'antigène O est hautement immunogène. Cependant, l'immunogénicité

diminue considérablement ou s'annule quand il est séparé du lipide A. [35]

IV.2.6. Essais de détection des endotoxines bactériennes :

Les endotoxines bactériennes sont toxiques par voie injectable à l'état de traces :

Une injection d'endotoxines dans la circulation sanguine provoque à partir de **5 EU** ou **UI/Kg/h** de poids corporel (ce qui correspond à environ **0,5 ng** d'endotoxine purifiée) :

- Maux de tête.
- Hypotension.
- Coagulation intra vasculaire disséminée.
- Choc pouvant aboutir à la mort.

Il n'existe aucun traitement spécifique, on a uniquement des traitements Symptomatiques d'où la nécessité de les détecter dans les préparations injectables (solutés, vaccins, perfusions). [51]

IV.2.6.1. Les tests de détection :

Les tests les plus utilisés sont :

- Le premier test de détection est un essai *in vivo* qui consiste à la recherche d'un effet pyrogène chez le lapin.
- Le deuxième test est un essai *in vitro*.

IV.2.6.1.1. Le test *in vivo* :

Ce test est un essai de recherche des pyrogènes chez le lapin.

Il s'agit d'injecter des préparations injectables stériles dans la veine de l'oreille du lapin.

Le paramètre de détection est l'augmentation de la température

Ceci s'explique par le fait que la sécrétion de pyrogènes endogènes par les cellules phagocytaires (monocytes, macrophages) entraîne une action au niveau des centres thermorégulateurs de l'hypothalamus en provoquant une hyperthermie par l'intermédiaire de la sécrétion de prostaglandines.

IV.2.6.1.2. Le test *in vitro* :

L'essai au Lysat d'amoebocytes de limule (**LAL**).

Le dosage des endotoxines bactériennes se fait par une réaction enzymatique réalisée *in vitro* à l'aide d'un réactif, le réactif lyophilisé, le Lysat d'amoebocytes de limule (**LAL**).

● **Le réactif au Lysat d'Amoebocytes de Limule**

Un des aspects les plus intéressants du **LAL** est sa source.

Le **LAL** est produit à partir du sang ou hémolymphe d'un animal marin ***Limulus polyphemus*** ou ***Xyphosura polyphemus***, communément appelé le limule ou crabe en fer à cheval. C'est un arthropode marin de la classe des Mérostomes, c'est à dire plus proche des scorpions que des crabes. [2]

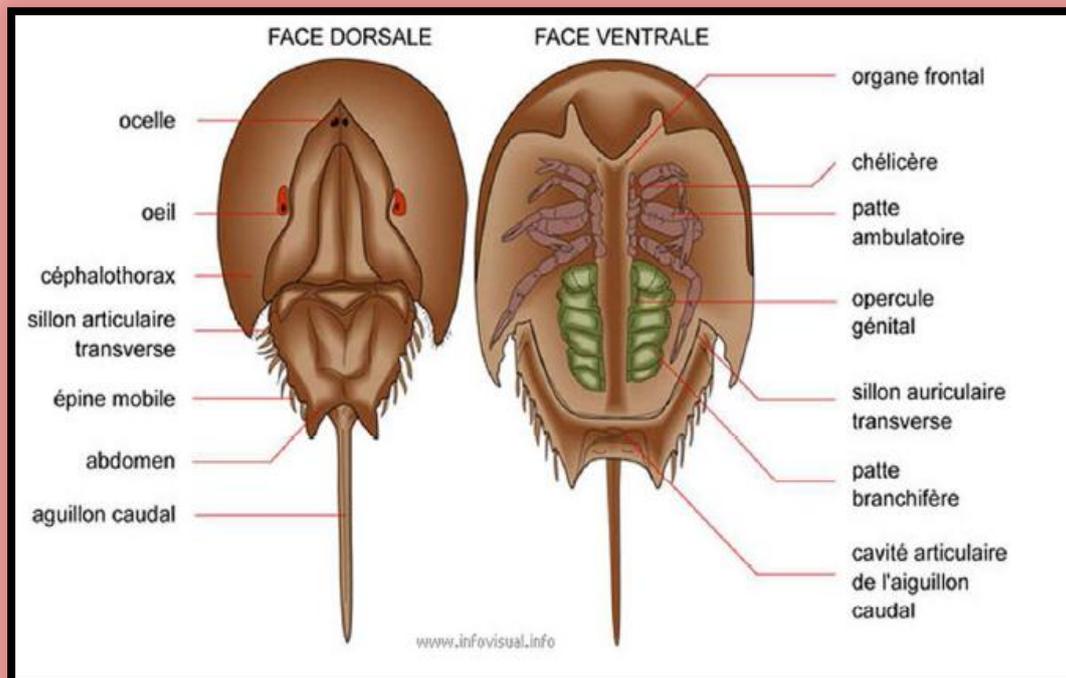


Figure 26: Morphologie d'une Limule [2]

Ils ont la particularité d'avoir un « système circulatoire ouvert » maintenant les organes dans le sang ou l'hémolymphe et les échanges (gaz, nutriments, déchets) s'y opère par simple diffusion. L'hémolymphe est composée de plasma contenant l'oxygène lié à l'hémocyanine (responsable de la couleur bleue, c'est une protéine riche en cuivre et non en fer) et des cellules appelées amoebocytes.

Quand le limule est agressé, les amoebocytes perdent leurs formes ovoïdes pour devenir poly-lobulés ; ils s'agrègent et forment un caillot protecteur à l'endroit de l'agression.

Ce phénomène se produit aussi quand les limules sont agressés par les endotoxines des bactéries Gram négatif. [51]

Le sang de limule est extrêmement sensible à la présence de bactéries Gram négatif, de sorte que la coagulation du sang se produit au contact de très faibles quantités d'endotoxines injectées. Les limules mouraient par coagulation intra-vasculaire.

Ce phénomène de coagulation de l'hémolymphe de *Limulus polyphemus* est à la base de l'essai au lysat d'amoebocytes de limule (**LAL**) pour la détection in vitro des endotoxines bactériennes.

● *Préparation du lysat*

Les amoebocytes du sang de limule sont séparés par centrifugation, le culot est lavé puis lysé. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation et le surnageant est stocké à +4°C pendant plusieurs mois ou congelé à -20°C. Le lysat est lyophilisé ; La sensibilité de chaque lot est déterminée et parfois ajustée par élimination totale ou partielle d'un facteur inhibiteur par extraction chloroformique. Celle-ci a comme inconvénient de provoquer la précipitation de certaines protéines. Certains lysats sont tamponnés et des cations divalents, en particulier **Mg²⁺**, sont ajoutés à différentes concentrations selon les réactifs.

Pour les techniques utilisant un substrat chromogène, le lysat est modifié en éliminant particulièrement la protéine coagulogène.

● *Le principe de la méthode LAL*

Lors de la mise en présence du **LAL** et d'endotoxines, la formation de coaguline s'accompagne de l'apparition d'un trouble qui est à la base des méthodes **LAL** par turbidimétrie, tandis que les molécules de coaguline vont s'agréger pour former un gel qui est à la base des techniques **LAL** par gélification. [52]

En fait, le mécanisme de coagulation du sang de limule en présence d'endotoxines fait suite à une série de réactions enzymatiques.

Les résultats obtenus par cette méthode **LAL** étaient historiquement donnés en unités de masse par volume de liquide ou d'air (**ng/ml** ou **ng/m³**) ou en masse par masse (**ng/mg**). Cependant, des résultats très dispersés ont été obtenus pour des essais de dosages **LAL** avec des préparations de **LPS** différents mais aussi pour des endotoxines identiques mais avec des lots de **LAL** différents. Ceci rend les essais comparatifs inter-laboratoires

impossibles. Pour éliminer ces problèmes, la **FDA** a mis au point une endotoxine étalon de référence (**RSE**) à partir d'Escherichia coli.

Cette préparation nommée **EC-5** a un potentiel fixé à dix unités d'endotoxines (**Eus**) par échantillon ce qui est équivalent à **10 EU/ng** d'Escherichia coli. Ainsi la **FDA** a exigé que tous les fabricants indiquent la sensibilité de chaque lot de **LAL** par rapport à l'étalon **EC-5 RSE**.

Les fabricants indiquent généralement dans leur kit de dosage une endotoxine étalon de contrôle (**CSE**) calibrée à l'aide de **RSE** pour chaque lot de lysat. [9]

● *Méthode par gélification*

Cette méthode repose sur la propriété qu'ont les endotoxines en très faible quantité de coaguler du **LAL**.

Des quantités équivalentes de **LAL** et de solution à tester sont placées dans des tubes en verre apyrogène, mélangées puis mises en incubation

À **37°C** pendant une heure. A la fin de l'incubation les tubes sont retournés si le gel s'est formé, la réaction est positive.

Ce test permet, après avoir déterminé la sensibilité du **LAL** d'évaluer la concentration minimale d'endotoxine produisant la coagulation du **LAL**. Par dilutions successives d'une endotoxine de référence dont la concentration est connue, on détermine coagulation se produit.

En divisant ce facteur par la concentration d'endotoxine standard, on obtient la sensibilité du **LAL**. Une procédure similaire permet de calculer la concentration d'endotoxine dans un échantillon. En multipliant le plus grand facteur de dilution pour lequel la gélification se produit par la sensibilité du **LAL**, on peut extrapoler la concentration maximale d'endotoxine dans l'échantillon.

● *Méthode turbidimétrique*

Ce test repose sur le principe que le précédent la turbidimétrie d'un liquide augmente quand il coagule. Le **LAL** est dilué de sorte qu'il n'y ait pas de coagulation possible. Quand les endotoxines sont ajoutées au **LAL** dilué, la solution floccule et sa turbidité est fonction de la concentration en endotoxines.

Une courbe d'étalon est réalisée à l'aide de dilution successive d'une endotoxine de référence, cette courbe permettant de déterminer la concentration en endotoxines dans un échantillon.

Le principe de cette méthode peut être appliqué :

- Soit à une méthode dite en « point final » si la mesure est faite au bout d'un temps d'incubation déterminé,
- Soit à une méthode cinétique, si les mesures de densité optique sont faites en continu ou au moins périodiquement pendant la réaction.

● **Méthodes chromogéniques**

Dans cette méthode, le **LAL** est combiné à une substance chimique :

Le 5-aminoacide-polypeptide (**5-pep**) lié à la paranitroaniline (**PNA**).

Sous l'action de la **coagulase** activée la liaison **5-pep-PNA** est coupée, libérant ainsi le **PNA**, qui peut être mesuré par spectrophotométrie (À **545 nm**).

La vitesse de libération du **PNA** est fonction de la concentration en endotoxines dans l'échantillon. [51]

IV.2.6. Critères de la validation:

La validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves effectives que les prescriptions particulières d'une méthode analytique sont remplies. La validation a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique déterminée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faudra donc définir correctement les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée. En effet la validation inclut la spécification des exigences, la détermination des caractéristiques des méthodes, la comparaison des exigences aux valeurs des caractéristiques de la méthode, ainsi qu'une déclaration relative à la validité ; Le choix d'une méthode est le point de départ véritable de la validation, si plusieurs méthodes sont concurrentes il faut sélectionner celle qui a le rapport coût-bénéfice le plus favorable (efficience). [43]

Les objectifs de la méthode doivent guider le choix des caractéristiques à évaluer. Pour un essai limite comme c'est le cas pour l'essai de recherche des endotoxines il faudra déterminer :

IV.2.6.1. La limite de détection:

C'est la plus petite quantité ou concentration qui peut être détectée, mais non quantifiée, avec un risque d'erreur connu.

IV.2.6.2. Spécificité:

Une méthode est spécifique lorsqu'elle permet de mesurer l'analyte avec la garantie que le signal instrumental ne provient que de l'analyte.

IV.2.6.3. Répétabilité:

La mesure de la fidélité, lorsque les mesures sont faites par le même opérateur, sur un même instrument, avec une méthode unique et dans un délai court.

IV.2.6.4. Reproductibilité :

Mesure de la fidélité, lorsque n'importe quelle condition change : plusieurs opérateurs d'exécution [41]

Il suffit de calculer la moyenne et l'écart type des valeurs obtenues pour un même spécimen au cours des séries indépendamment effectuées en exploitant les formules :

$$m = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m)^2}{n-1}}$$

m = moyenne

S = écart-type

x_i = chaque valeur

n = nombre total de valeur

IV.3. Propreté :

La microbiologie est la science qui s'intéresse aux bactéries, levures, moisissures et virus cette définition du dictionnaire livre le champ d'investigations auquel devrait s'appliquer le contrôle des produits non stériles. Il est singulier, à ce jour, de constater que les principales normes ou monographies en vigueur s'adressent principalement aux bactéries, levures et moisissures et peu aux virus.

Pourtant, l'eau, par exemple, matière première de nombreuses formules ou procédés de fabrication, agent de nettoyage, est un parfait vecteur de transport de ce type de micro-organismes. Nous nous limiterons donc, dans cette étude, à la quantification des trois premiers types de micro-organismes, laissant à la virologie le soin de combler ce vide.

La présence de la flore mésophile doit être réglementairement, ou pour des raisons économiques, recherchée et quantifiée sur de très nombreux produits qui concernent les produits de santé : médicaments et leurs matières premières de départ ou de process, produits cosmétiques, produits diététiques, et enfin dispositifs médicaux ; La démarche est, quels que soient les textes réglementaires suivis, la même [42]

IV.3.1. Techniques classiques de la pharmacopée européenne :

IV.3.1.1. Méthodes quantitatives :

Les essais décrits pour le contrôle microbiologique des produits non stériles dénommé aussi « dénombrement des germes aérobies viables totaux » permettent le dénombrement des bactéries mésophiles, des moisissures et levures capables de se développer en aérobiose.

Ces essais servent avant tout à déterminer si un produit est conforme aux exigences microbiologiques spécifiées de sa monographie, à la pharmacopée.

Les trois techniques les plus couramment utilisées sont : la méthode de filtration sur membrane, la méthode de dénombrement sur plaque et la méthode du nombre le plus probable. [50]

Les textes réglementaires précisent généralement que, quelle que soit la technique utilisée, il est nécessaire de la valider.

IV.3.1.1.1. Échantillonnage et préparation de l'échantillon :

➤ Échantillonnage

Le prélèvement doit être effectué par du personnel formé aux techniques de prélèvements microbiologiques afin d'éliminer tout risque de contamination accidentelle du produit. Le plan d'échantillonnage dépend de nombreux paramètres tels que taille du lot, caractéristiques du produit, niveau de contamination présumé du produit, homogénéité de distribution des micro-organismes.

Dans le cas de dispositifs, le nombre d'éléments prélevés devra être représentatif du lot.

➤ Préparation de l'échantillon

- Produits hydrosolubles

En général, une solution est préparée en diluant la quantité prélevée dans un diluant (solution tampon peptonée au chlorure de sodium **pH 7,0** par exemple ou tout autre diluant approprié).

Le rapport de dilution le plus fréquent est de **1/10** mais il peut être adapté aux caractéristiques du produit ou à une sensibilité requise différente.

Si le produit possède un pouvoir antimicrobien, un agent neutralisant peut être ajouté au diluant en prenant soin d'ajuster ensuite le **pH à 7** environ si nécessaire. [50]

- Produits de nature non lipidique insolubles dans l'eau

La préparation est identique à la précédente hormis le fait qu'un agent tensio-actif peut être ajouté au diluant pour une meilleure mise en suspension. Le tensio-actif le plus couramment utilisé est le

Polysorbate 80 ; De même que précédemment, si le produit possède un pouvoir antimicrobien, un agent neutralisant peut être ajouté dans les mêmes conditions.

- Produits de nature lipidique

La présence d'un agent tensio-actif est ici nécessaire. Il est ajouté en quantité égale à la moitié de la masse du produit à examiner maximum, et mélangé en chauffant si nécessaire à une température maximum de **40°C**.

Le mélange ainsi obtenu est ensuite amené à dilution au **1/10** avec le diluant déjà décrit à la même température. [49]

- Dispositifs médicaux

Les dispositifs médicaux, comme par exemple les cuillères doseuses,

Les compte-gouttes, les trocarts de transvasement sont immergés dans le diluant précédemment décrit, par exemple.

- ***Dispositifs transdermiques***

Après retrait du film protecteur, les dispositifs transdermiques sont placés :

- pour moitié de l'échantillon, dans une solution de tampon peptoné au chlorure de sodium **pH 7,0** pouvant contenir des inactivateurs appropriés. Ils sont ensuite soumis à une agitation énergique pendant **30 min** au moins (préparation A) ;
- pour l'autre moitié de l'échantillon, dans du milieu liquide **D** et soumis également à une agitation énergique pendant **30 min** (préparation B : recherche des entérobactéries et autres bactéries gram-négatives). [45]

IV.3.1.1.2. Examen des échantillons (méthodes utilisées) :

En règle générale, le contrôle microbiologique des produits non stériles est réalisé soit par la méthode de filtration sur membrane, soit par la méthode de dénombrement sur plaque. On utilisera la méthode du nombre le plus probable quand le dénombrement microbien ne peut être réalisé par l'une des deux premières, du fait de la nature du produit (corps gras) ou du nombre de micro-organismes présumé.

➤ ***Méthode de filtration sur membrane***

L'isolement des micro-organismes est réalisé par la filtration sur des membranes filtrantes de porosité nominale de **0,45µm** pour lesquelles l'efficacité de rétention bactérienne a été montrée.

Une attention toute particulière doit être apportée au matériau constituant la membrane. En effet, le produit à examiner ou l'un de ses constituants ne doit pas modifier l'efficacité de rétention bactérienne..

➤ ***Méthode de dénombrement sur plaques***

Deux techniques sont possibles pour la réalisation de cette méthode, soit par ensemencement en profondeur, soit par étalement en surface.

- ***Par ensemencement en profondeur***

L'échantillon (de l'ordre de **1 ml**) est introduit dans une boîte de Pétri puis mélangé à un milieu gélosé liquéfié adapté soit à la culture des bactéries soit à la culture des moisissures et des levures à une température ne dépassant pas **45 °c**.

La quantité de milieu employé sera adaptée à la taille de la boîte de Pétri utilisée. Le test est réalisé en double pour chaque milieu et chaque dilution. Les boîtes sont incubées **5** jours dans les conditions de température décrites précédemment pour les bactéries d'une part et les levures-moisissures d'autre part.

Le dénombrement s'effectue sur les boîtes présentant le plus grand nombre de colonies inférieur à **300** (**100** pour les levures et moisissures).

La moyenne arithmétique des dénombrements permet le calcul du nombre **UFC** par gramme ou par millilitre.

- *Par étalement en surface*

L'échantillon de **0,1 ml** au moins est étalé à la surface de boîtes de Pétri dans lesquelles auront été coulés puis solidifiés des milieux gélosés appropriés à la culture des bactéries ou des moisissures et levures.

Tout comme dans le cas de l'ensemencement en profondeur, deux boîtes de Pétri par milieu et par dilution sont préparées. De même, les conditions d'incubation et les calculs seront effectués comme précédemment.

➤ *Méthode du nombre le plus probable*

Comme nous l'avons déjà mentionné, cette méthode ne doit être utilisée que lorsque l'emploi des deux autres est impossible du fait d'une fidélité et d'une exactitude inférieure. De plus, les résultats obtenus pour le dénombrement des moisissures sont peu fiables.

La méthode repose sur une série d'au moins trois dilutions au **1/10** successives du produit ; On prélèvera ainsi trois fois **1 g** ou **1 ml** de chaque dilution que l'on transférera dans trois tubes contenant chacun **9 à 10 ml** d'un milieu liquide approprié additionné si nécessaire d'un tensio-actif ou d'un agent neutralisant ; Les tubes sont incubés à **30-35 °c** pendant **5** jours.

Pour chaque dilution, on notera le nombre de tubes présentant une pousse microbienne. [49]

Pour la Pharmacopée européenne, on se reportera par exemple au (**Tableau 9**)

Tableau 9 – Valeurs du nombre le plus probable de bactéries [50]

Trois tubes pour chaque niveau de dilution							
Nombres de tubes positifs			NPP par gramme	Catégories		Limites de confiance à 95%	
0.1g	0.01g	0.001g		1	2		
0	0	0	< 3			–	–
0	1	0	3		X	< 1	17
1	0	0	3	X		1	21
1	0	1	7		X	2	27
1	1	0	7	X		2	28
1	2	0	11		X	4	35
2	0	0	9	X		2	38
2	0	1	14		X	5	48
2	1	0	15	X		5	50
2	1	1	20		X	8	61
2	2	0	21	X		8	63
3	0	0	23	X		7	129
3	0	1	38	X		10	180
3	1	0	43	X		20	210
3	1	1	75	X		20	280
3	2	0	93	X		30	390
3	2	1	150	X		50	510
3	2	2	210		X	80	640
3	3	0	240	X		100	1400
3	3	1	460	X		200	2400
3	3	2	1100	X		300	4800
3	3	3	>1100	X		–	–

IV.3.1.1.3. Interprétation des résultats et limites de contamination :

Le nombre de germes viables totaux correspond à la somme du nombre de bactéries et du nombre de moisissures et levures (supposés égaux aux nombres UFC).

Il peut s'avérer que certains micro-organismes se développent sur les deux milieux utilisés. Dans ce cas, la valeur obtenue peut être corrigée.

Dans le cas de la méthode du nombre le plus probable, la valeur donnée représente le nombre de bactéries. [49]

Des limites de contamination microbienne sont, en règle générale, données soit en tant que limites prescrites dans les monographies, soit en tant que recommandations. C'est le cas des préparations pharmaceutiques, pour lesquelles est publié « à titre d'information » dans la Pharmacopée européenne. [32]

Il s'agit des quatre catégories qui sont déjà définies dans le chapitre (II)

IV.3.1.1.4. Solutions et milieux de culture recommandés :

La composition des solutions et des milieux de culture est parfois donnée à titre d'information ou de recommandation. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de montrer que leurs propriétés nutritives et sélectives sont satisfaisantes pour l'essai concerné.

Cependant, le choix est primordial dans la mesure où l'on peut dans certains cas aboutir à des résultats sensiblement différents pour une même méthode et des milieux différents. C'est pour cette raison que dans le domaine pharmaceutique, par exemple, un travail d'harmonisation internationale a été conduit sur la base d'une comparaison des méthodes, critères d'acceptation et milieux, solutions tamponnées et agents neutralisants des monographies des Pharmacopées européenne, américaine et japonaise. [50]

IV.3.1.1.5. Agents neutralisants :

Nous avons vu qu'il peut parfois être nécessaire de neutraliser un possible pouvoir antimicrobien en additionnant le diluant d'agents neutralisants.

Ainsi, par exemple, le jaune d'œuf est utilisé pour neutraliser les composés à fonction ammonium quaternaire, le thiosulfate de sodium pour neutraliser les composés halogénés.

Les teneurs en agents neutralisants peuvent être augmentées si nécessaire mais, dans tous les cas l'efficacité et la non toxicité à l'égard des micro-organismes considérés doivent être prouvées. [26]

IV.3.1.1.6. Recherche de germes spécifiés :

Dans certains cas, il est demandé de rechercher, en parallèle à la flore mésophile, des germes spécifiés, soit témoins d'un niveau de contamination, soit dont la présence est indésirable.

Lors de cette recherche, il est nécessaire de revivifier les micro-organismes dans la mesure où l'utilisation de milieux sélectifs employés n'autorise pas la mise en évidence de micro-organismes ayant subi des lésions sublétales.

Les milieux utilisés pour l'étape de revivification ou de culture, tout comme les températures d'incubation préconisées sont primordiales dans cette recherche. [37]

Pour les entérobactéries et certaines autres bactéries Gram-négatives l'essai décrit dans la monographie de la pharmacopée européenne, permet la mise en évidence de bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* mais aussi d'autres types de bactéries comme les *Aeromonas* et *Pseudomonas*.

Deux essais peuvent être conduits : l'absence de croissance de colonies de bactéries Gram-négatives sur plaque ou l'évaluation quantitative.

Dans les deux cas, les entérobactéries sont isolées à partir de subcultures sur milieu gélosé sélectif.

Pour l'examen de dispositifs transdermiques, une partie aliquote de préparation **B** est filtrée sur membrane stérile qui est transférée dans un milieu enrichi ; Après incubation, ce dernier est étalé sur gélose spécifique pour cette recherche *Escherichia Coli*, *Salmonelles*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. [50]

IV.3.2. Techniques rapides de contrôle microbiologique :

Les techniques de contrôle microbiologique mises en œuvre dans l'industrie pharmaceutique sont standardisées par les Pharmacopées.

Elles ont souvent un temps de réponse relativement long et sont difficilement automatisables. D'autres industries, alimentaires, cosmétiques, ont déjà pu bénéficier de techniques alternatives. Sous réserve d'une validation, certaines de ces techniques semblent pouvoir être adaptées au domaine pharmaceutique, soit pour des protocoles de la Pharmacopée européenne (contamination initiale, étude des eaux, etc.), soit pour des contrôles « In process » permettant le cas échéant de prendre des mesures correctives à temps. Nous pouvons distinguer deux groupes de techniques : celles correspondant à l'amélioration d'une méthode classique détectant une croissance et les techniques alternatives de détection rapide.

IV.3.2.1. Amélioration d'une technique classique :

Certaines étapes des techniques classiques de contrôle microbiologique peuvent bénéficier d'améliorations qui vont grandement faciliter la mise en œuvre de ces protocoles, mais le gain de temps ne

touchera pas la phase de croissance des micro-organismes et sera donc limitée, ces améliorations ça concernent soit :

- ✓ La Préparation des échantillons
- ✓ Milieux de culture et souches bactériennes
- ✓ Méthodes d'ensemencement
- ✓ Systèmes de lecture

IV.3.2.2. Techniques alternatives :

Ces techniques alternatives de détection rapide vont causer un gain de temps en supprimant ou en raccourcissant la phase de croissance bactérienne nécessaire dans les techniques classiques pour visualiser les micro-organismes, ça concernent :

- ✓ Méthodes microscopiques et méthodes dérivées
- ✓ Détection de métabolites

IV.3.2.3. Applications des principales techniques alternatives dans l'industrie pharmaceutique :

IV.3.2.3.1. Appareils utilisés :

IV.3.2.3.1.1. Appareils d'impédancemétrie : applicable pour :

- l'essai de stérilité,
- le titrage microbiologique des antibiotiques,
- le test d'efficacité des conservateurs,
- le test d'efficacité d'antiseptiques et désinfectants,
- le contrôle de la contamination microbienne dans des produits non obligatoirement stériles et recherche des microorganismes spécifiés,
- l'analyse des eaux,
- le contrôle des fermentations.

Les différences principales entre les appareils d'impédancemétrie concernent le nombre et le type de signaux électriques mesurés ainsi que le volume des cellules et leur nombre par unité d'incubation.

C. Bactométer

Le Bactométer (fabriqué aux États-Unis, distribué par **BioMérieux**) mesure soit la conductance soit la capacitance. Ses cellules de mesure se

présentent sous forme de modules composés de **16** cuvettes en matière plastique à usage unique.

D. Rabbit (Rapid Automated Bacterial Impedance Technique)

Le Rabbit (fabriqué en Angleterre par Don Whitley Scientific et distribué en France par AES Laboratoire) mesure uniquement le signal de conductance. Les cellules en polypropylène autoclavables et donc réutilisables, ont un volume utile de **10 ml**. Les deux électrodes de mesure se situent au fond de la cellule.

IV.3.2.3.1.2. Cytométrie de flux (appareil ChemFlow) :

Nous décrivons le système ChemFlow commercialisé par la société Chemunex, qui aujourd'hui est dédié aux dénombrements microbiologiques industriels; Le système est composé d'un cytomètre analyseur qui peut être équipé d'un automate de préparation et d'injection d'échantillon, applicable pour :

- le contrôle « in process » d'une boucle d'eau purifiée,
- le contrôle de la contamination microbienne dans des produits non obligatoirement stériles et recherche des microorganismes spécifiés (suspension buvable) ;

IV.3.2.3.1.3. Cytométrie à balayage laser (appareil Chemscan) :

Les éléments optiques et électroniques du système sont réunis dans un appareil compact commercialisé par la société Chemunex, ces applications les mêmes que celle de la Cytométrie de flux.

IV.3.2.3.1.4. Bioluminescence :

Ces applications les mêmes que celle de la Cytométrie de flux.

partie Pratique

1. TEST DE STERILITE :

On a travaillé sur le produit suivant :

Nom commercial du produit : CEFAZAL®

DCI : CEFAZOLINE

Forme et Dosage : Injectable 1g

N°de lot : X



Spécification techniques microbiologiques :

Liste des tests	normes	références
Test de stérilité	conforme	Usp34

Protocole d'analyse

1. But :

Contrôle de la stérilité bactérienne et fongique des produits selon la technique des membranes filtrantes.

2. Principe :

L'appareil « STERITEST COMPACT » est conçu pour contrôler une grande variété de produits se présentant sous divers types de conditionnement ; ce procédé consiste à faire passer le produit à examiner à travers des membranes filtrantes via un système clos.

Les membranes seront ensuite incubées pendant 14 jours ;

Le nombre des échantillons à examiner par lot est de 20 unités.

3. Matériels et Appareillage :

3.1. Appareillage



***Hotte à flux d'air laminaire stérile (Hc36)**



***Stérite compact (millipore)**

*Deux étuves :

- ✓ une réglée à une température **30-35°** favorisant le développement de bactéries aérobies et anaérobies et
- ✓ l'autre à **20-25°** permettant la prolifération des champignons et celle des moisissures.

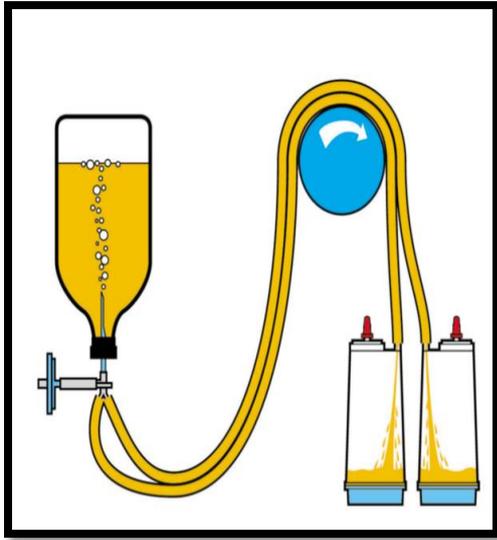


Pour les bactéries



Pour les levures

3.2. Matériels et consommable :



*** Unité stériltest spécifique.**



***Boites de pétri.**



***Gants stériles**



***Ciseaux stériles.**

- *Seringue stérile.
- *Filtre 0.22um.
- *Alcool.
- * Bec bunsen

*** Compresses stériles.**

- *Petit flacon vide stérile.
- * Eau de javel.
- *Vaporisateur d'alcool.

3.2.1. Réactifs et milieux de culture :

- Solution de rinçage (fluide A) 600ml,
- Eau physiologique 9‰ stérile 500ml,
- Milieu de thioglycolate 100ml, pour les bactéries.
- Milieu typtone soja 100ml pour les moisissures.

4. Modes opératoire :

4.1. Préparation du test :

4.1.1. Deux heures avant le test :

- Désinfecter la hotte à flux d'air laminaire à l'aide d'eau de javel.
- Désinfecter l'appareil stéritest compact avec de l'eau de javel avant son introduction dans la hotte.
- Le placer à l'intérieur de la hotte et décontaminer l'ensemble avec l'alcool.
- Désinfecter le bec bunsen, l'échantillon, les milieux de culture, la solution de rinçage ainsi que l'unité stéritest à l'eau de javel et les déposer à portée de main dans la hotte
- Prévoir 2 poubelles : dans l'une plonger l'extrémité du tuyau d'évacuation et l'autre posée sur le sol destinée à recevoir les emballages, les flacons ...ext.
- Laisser les lampes germicides **UV** allumées toute la nuit.

4.1.2. Le test :

- Ne pas oublier d'éteindre les lampes **UV** avant d'entrer dans la salle de contrôle ; s'installer convenablement près de la hotte allumer le bec bunsen, se désinfecter les mains à l'alcool, mettre les gants stériles et se désinfecter encore une fois.
- Prendre le blister (contenant l'unité stéritest), l'ouvrir et placer les deux chambres de filtration /incubation dans les compartiments appropriés.
- Placer les tubulures autour de la pompe tout en gardant une longueur suffisante de part et d'autre.

- Allumer l'appareil et régler la vitesse de la pompe à 55.

4.2. Procédure :

4.2.1. Pré-mouillage des membres :

- Placer les bouchons rouges sur les événements (Élimination de prise d'air)
- Décontaminer le septum du flacon de solution de rinçage avec une compresse stérile imbibée d'alcool, placer le filtre événement et accrocher le flacon au niveau de la potence.
- Flamber l'aiguille test, piquer le bouchon du petit flacon.
- Pomper environ 40ml de fluide à travers ce petit flacon stérile.
- Arrêter la pompe et poser le flacon sur le plan de la hotte.

4.2.2. Reconstitution des échantillons :

- Soulever le flip-off du premier flacon de fluide A et décontaminer ce dernier avec l'alcool.
- Retirer le filtre événement de la solution de rinçage le flamber et le placer dans le deuxième flacon de fluide A, l'accrocher au niveau de la potence.
- Soulever le flip-off du premier flacon de l'échantillon et le décontaminer avec l'alcool.
- Retirer l'aiguille test petit flacon vide stérile la faire passer à la flamme et l'insérer dans le premier flacon de l'échantillon.
- Reconstituer ce flacon avec le fluide A stérile jusqu'à l'obtention d'une solution claire.
- Retourner le flacon par millipore (septum vers le bas) et aspirer la totalité de son contenu.
- Répéter cette opération sur les **19** flacons restants du lot.

Remarque :

Il est impératif de passer l'aiguille à la flamme après chaque usage à la laisser refroidir afin d'éviter l'élimination des germes éventuellement présents au niveau de l'échantillon.

4.2.3. Rinçage des membres :

- Rincer les membres avec 600ml de fluide A.

Pour éliminer les résidus de la solution de rinçage des tubulures laisser l'aiguille dans le dernier flacon de rinçage et faire tourner la pompe jusqu'à ce que les tubulures soient claires.

- Enlever les capuchons rouges.

- Surélever les chambres de filtration /incubation placer à leur bases au niveau des orifices de filtration les capuchons jaunes et les remettre dans leurs compartiments.

4.2.4. Transfert des milieux de culture :

- Décontaminer le septum du flacon du premier milieu de culture.
- Flamber l'aiguille de prélèvement et piquer le bouchon de ce dernier : clamber l'un des deux tubulures au moyen des clamps bleus à 2cm environ de l'aiguille de prélèvement (aiguille test) en faisant tourner.
- Transférer le milieu tryptone soja vers l'une des chambres.
- Retirer l'aiguille de prélèvement du premier milieu, la flamber en faisant tourner la pompe jusqu'à ce que la tubulure soit claire.
- Décontaminer le septum du flacon de deuxième milieu de culture.
- Passer de nouveau l'aiguille de prélèvement dans la flamme et l'introduire dans le deuxième milieu.
- Déplacer le clamp vers l'autre tubulure et transférer le milieu thioglycolate.
- Retirer l'aiguille de prélèvement de deuxième milieu, la flamber en faisant tourner la pompe jusqu'à ce que la tubulure soit claire.
- Le transfert achevé, clamber les deux tubulures à 6cm et à l'aide de ciseaux stérile, couper à environ 2 cm et recouper les tubulures sur les événements formant une boucle de sorte les chambres soient fermées.
- Etiqueter les deux chambres en inscrivant :
 - Nom du produit.
 - Numéro de lot.
 - Date.
 - Analyste.
 - Milieu.
- Incuber pendant 14 jours les chambres dans les étuves :
Thioglycolate **32°C**, Tryptone soja à **22°C**.

5. Interprétation des résultats :

- On préconise 14 jours d'incubation aucune croissance microbienne n'a été décelée dans les deux chambre.
Donc le produit « céfazal » est **conforme**.
- Si au contraire on constate une croissance microbienne, un

Deuxième contrôle sera effectuée sur **40** flacons (le double) si aucune croissance n'est observée au **14** ème jour le produit est dit **conforme**.

- Si une croissance microbienne est constatée on ré-effectue un contrôle sur **60** flacons ; si aucune croissance n'est observée au **14** jour le produit est dit **conforme**.

2. TEST DES ENDOTOXINES:

Le produit qu'on a utilisé pour cette analyse c'est l'imécistal injectable 500mg/500mg, c'est un antibiotiques à usage hospitalier pour les perfusions.

NOM du produit : IMECISTAL

DCI : IMPENEME et CILASTATINE

Forme et Dosage : Injectable 500mg/500mg

N° de lot : Y

Spécification techniques microbiologiques :

Liste des tests	normes	références
Test des endotoxines (test de LAL)	$\leq 0.17\text{UE/mg}$	Usp30

1. But :

Rechercher des endotoxines bactérienne dans un échantillon d'imécistal 1g par la méthode de LAL gélification.

2. Principe :

Procoagulase → coagulase → coagulogènes → coaguline + peptide c
↑
Endotoxine

- Les endotoxines activent une pro-enzyme du **LAL**, l'enzyme activée hydrolyse des liaisons spécifiques au niveau de coagulogène également présent dans le **LAL** la coaguline résultant du l'hydrolyse s'agrège et un caillot gélatineux se forme.

3. Matériel et appareillage :

3.1. Appareillage :

- Hotte à flux d'air laminaire stérile (HC36).
- Vortex (bioblock).



- Incubateur (bain marie) type MEMMERT

3.2. Matériels et consommable :

- Micropipette (200ul et 1ml).
- Embouts stériles et apyrogènes (référence 2026, 2027, 200ul et 1ml).
- Tubes à dilutions apyrogènes (référence LN207).
- Portoirs
- Gants stériles.
- Parafilm.
- Ciseaux.

3.3. Réactifs : (Cambrex Science Walkersville Inc)

- Lysat d'Amoebocytes de limule (LAL) (référence N183-125)
- Endotoxines (CSE) (référence 7360)
- Eau apyrogènes (5ml/flacon) (référence W50-640).
- « CSE (Endotoxine Standard de Contrôle) »

Remarque :

La CSE se conserve un mois entre **2-8°C** le lysat reconstitué conserve à **-10°C** pendant un mois.

4. Mode opératoire :

Chaque dosage d'échantillon devra comporter un tube contrôle négatif (eau apyrogène), un tube contrôle positif, deux tubes d'échantillon et deux tubes contrôles positifs dans le produit ou **P.P.C** (produit positifs control).

- Reconstituer l'endotoxine étalon par **5ml** d'eau apyrogène vortexer 10mn la solution si l'endotoxine est déjà reconstituée vortexer **5mn**.
- Diluer cette solution à **1/6.8** selon la **DMS**.
- Diluer l'endotoxine à **0.17 EU/ml** activité indiquée sur le certificat du fournisseur de façon à avoir une concentration finale de **20λ**.
- Vortexer **1mn** cette dilution.

Dans les tubes de réaction distribuer selon le tableau ci-dessous, l'eau **LAL**, l'échantillon à doser et l'endotoxine étalon à **20λ**.

- Vortexer l'endotoxine avant de prélever.
- Vortexer quelques secondes les tubes **P.P.C** pour bien mélanger la surcharge ajoutée à l'échantillon.
- Pré-incuber les tubes à **37°C ± 1°C** pendant **5mn**.
- Reconstituer un flacon de lysat par la quantité indiquée (sur l'étiquette) d'eau **LAL** mélanger la suspension sans vortexer jusqu'à dissolution complète du lysat.
- Retirer les tubes de l'incubateur, puis ajouter à chacun **100ul** de lysat, agiter doucement chaque tube avant de remettre en incubation **01h à 37°C**.

Remarque :

- λ est la sensibilité du lysat indiquée dans le certificat d'analyse du fournisseur.

➤ Détermination de la DMS

La dilution maximale significative est la dilution du vaccin à utiliser dans l'essai pour pouvoir établir, avec un niveau d'assurance maximale, qu'un résultat négatif signifie que la teneur en endotoxines du vaccin est inférieure à la limite en endotoxines, et qu'un résultat positif signifie que le lysat a

réagi à une concentration d'endotoxines au moins égale à la limite en endotoxines.

Pour un produit liquide et un lysat de sensibilité égale à λ UE/ml, la DMS est égale à :

DMS= limite en endotoxines / λ

➤ Dans notre cas l'imécistal est une poudre il faut là reconstituer donc on a :

- La limite en endotoxines est ≤ 0.17 UE/mg.
- **500 mg** : la concentration de l'échantillon (l'imécistal)
- **0.125UE/ml** : la sensibilité lysat.
- **100 ml** : volume de la reconstitution.

Donc : **0.17UE**  **1mg**
x  **500mg**

x=85UE qui est reconstitué avec **100ml** donc :
85UE/100ml=0.85UE/ml (limite en endotoxines) alors :

$$\text{DMS} = \frac{85\text{UE/ml}}{0.125\text{UE/ml}} = 6.8$$

Remarque :

Le chronomètre doit être déclenché dès que le premier tube est remis à incuber, respecter des intervalles réguliers de distribution du lysat.

Tableau récapitulatif :

Tubes	Eau LAL	Echantillon	Endotoxine 20 λ
Contrôle -	0.1ml	-	-
Contrôle +	0.1ml	-	10ul
Dosage 1	-	0.1ml	-
Dosage 2	-	0.1ml	-
P.P.C 1	-	0.1ml	10ul
P.P.C2	-	0.1ml	10ul

5. Résultats et interprétation :

- Les lectures des tubes se fait retournant chacun à 180°c, il n'est pas possible de prendre en compte les résultats obtenus sur l'échantillon qu'après avoir vérifié l'absence de gel dans le tube « contrôle négatif » (témoin de l'apyrogénicité), et la présence de gel dans les tubes « contrôle positif » (témoin de l'efficacité du lysat).
- Les deux tubes dosage sont négatifs c'est-à-dire ne présentent pas un gel ferme tenant au fond au contraire le gel coule le long des deux tubes donc l'échantillon testé renferme moins de λ EU/ml l'imecistal est dit alors **apyrogène**.

Précautions :

Le gel est très fragile éviter toutes vibrations autour de l'incubateur pendant le déroulement de la réaction, le retournement des tubes ne peut se faire qu'une seule fois.

3. TEST DE PROPRETRE :

Dans ce test on a travaillé sur le produit suivant : **L'AMPAL** gélule 500mg c'est un antibiotique.

NOM DU PRODUIT : AMPAL®

DCI : AMPICILLINE TRIHYDRATEE

FORME ET DOSAGE : Gélule 500g

N° de lot : Z



Spécifications techniques microbiologiques

Liste des tests	Normes	Références
Recherche des germes aérobies totaux	$\leq 10^3$ par g ou par ml	BP 2008
Recherche des champignons et moisissures	$\leq 10^2$ par g ou par ml	BP 2008
Recherche d'Escherichia Coli	Absence par g ou par ml	BP 2008

Protocole d'analyse

- Le Test de pureté de l'Ampal gélule basé sur :

1. Principe :

L'Ampal gélule, fait partie de la **catégorie 3A** concernant les préparations pour administration orale.

2. Appareillage et matériel :

- Balance de précision.
- Etuve à 25°C.
- Etuve à 35°C.
- Etuve à 37°C.
- Etuve à 44°C.
- Bec bunsen.
- Bain-marie.
- Autoclave.
- Tubes à essai.
- Boîtes de pétri (90 mm de Ø).
- Portoirs, spatules, ciseaux, gants stériles.

3. Réactifs, milieux de culture et consommables :

- Tampon peptone (TSE).
- Tween 80.
- Gélose trypticase soja (TSA).
- Gélose sabouraud + chloramphénicol (S+ C).

- Bouillon trypticase soja (TSB).
- Bouillon Macconkey.
- Gélose Macconkey.
- Eau de javel.

4. Mode opératoire :

La technique doit se dérouler dans des conditions de stérilité (À proximité d'une flamme d'un bec bunsen).

a. Veille du test :

Stérilisation de la verrerie et du matériel.

b. Jour du test :

- Préparation du diluant neutralisant (DN) : 85 ml de TSE + 01 ampoule de tween 80.
- Peser 10 g de l'échantillon à tester et l'introduire dans le DN, bien agiter. (Dilution 1/10)
- Mettre cette dernière dans l'étuve à 37°C, 5 à 10 minutes afin d'assurer une bonne dissolution de la poudre (solution mère SM) :
- Prélever 10 ml de la SM et l'introduire dans 100 ml de TSB.
- Prélever 1 ml de la SM et l'introduire dans TSA.
- Prélever 1 ml de la SM et l'introduire dans S + C

c. Incubation :

- TSB → 35°C - 37°C, pendant 18 à 48h.
- TSA → 30°C - 35°C, pendant 5 jours.
- S+C → 20°C - 25°C, pendant 5 jours.

d. 48h après le test :

Lecture du TSA et S+C.

Lecture du TSB :

- TSB clair → Absence de germes.
- TSB trouble → Recherche d'Escherichia coli :
 - Repiquage sur bouillon Macconkey : prélever 1 ml de TSB trouble et l'introduire dans 99 ml de bouillon Macconkey.
 - L'incuber à 43 - 45°C, pendant 18 - 24 heures.

e. 72 h après le test (24h après repiquage sur bouillon Macconkey) :

- Lecture du bouillon Macconkey
 - Bouillon Macconkey clair → absence d'Escherichia coli.
 - Bouillon Macconkey trouble → repiquage sur gélose Macconkey :
 - Prélever à l'aide d'une anse de platine une goutte du bouillon Macconkey trouble et la repiquer sur gélose Macconkey.
 - L'incuber à **35°C - 37°C**, pendant **18 - 72h**.

f. 04 jours après le test (24h après repiquage sur gélose Macconkey) :

- Lecture de la gélose Macconkey :
 - Absence de colonie (s) → Absence de Escherichia coli.
 - Présence de colonie(s) → Identification de germe.

(La croissance de colonies rouges, généralement non-muqueuse, indique la présence probable de d'Escherichia coli).

g. 05 jours après le test :

- Lecture du TSA et S+C :
 - Absence de colonie (s) → Absence de germes.
 - Présence de colonie (s) → Dénombrement des germes.

5. Interprétation des résultats :

Après 48h d'incubation :

produit	N° de lot	Dilution	germes viables totaux	levures et moisissures	E.coli
Ampal 500mg	z	10⁻¹	0	0	clair Absence
		10⁻²	0	0	
		10⁻³	0	0	
		10⁻⁴	0		

Après 5jours d'incubation :

produit	N° de lot	Dilution	germes viables totaux	levures et moisissures
Ampal 500mg	z	10 ⁻¹	0	0
		10 ⁻²	0	0
		10 ⁻³	0	0
		10 ⁻⁴	0	0

Résultats :

- Absence de germes viables totaux.
- Absence de levures et moisissures.
- Absence d'Escherichia. Coli.

❖ D'après les résultats trouvés et tant que :

- Le dénombrement des germes aérobiques $\leq 10^3$.
- Le dénombrement des germes fongiques $\leq 10^2$.
- Absence totale d'Escherichia coli.

Donc : le Produit (AMPAL gélule 500mg) est **conforme**.

Conclusion :

- D'après les résultats obtenus des trois tests les produits analysés (Céfazal[®], Imécistal[®], Ampal[®]) sont conformes.

Conclusion Générale

■ Un médicament est un produit pas comme les autres dont sa composition possède des propriétés curatives et préventives à l'égard des maladies, il doit répondre à cinq exigences fondamentales : qualité, efficacité, pureté, identité et sûreté ; Il ne peut être mis en circulation qu'à l'issue de contrôles de la qualité portant sur toute la chaîne de production, le risque médicamenteux constitue un problème majeur de santé publique tant sur le plan clinique que sur celui des coûts.

■ Dans ce but la direction du laboratoire définie, mis en œuvre et entretient un système qualité approprié au champ de ses activités, y compris au type, à la gamme et au volume des activités d'analyse et/ou d'étalonnage, de validation et de vérification qu'il entreprend, elle s'expose ses politiques, systèmes, programmes, méthodes et instructions dans toute la mesure.

■ Le contrôle final est une obligation et la façon de s'assurer que le produit obtenu est conforme aux besoins du client ; C'est une sorte de filtre destiné à piéger les produits non conformes, ceux qui ne satisfont pas à une exigence spécifiée ; Donc Cette étroite surveillance permet de protéger le patient, lui assure que son médicament est produit avec une qualité biochimique et microbiologique régulière, répondant à des critères précis, dans le cadre d'une procédure validée, reproductible.

■ Ce qu'il faut retenir à partir de notre étude que toute installation de production des médicaments ne peut fonctionner qu'avec l'aval des autorités de santé, elle doit mettre en œuvre une politique de la qualité afin de garantir, dans l'intérêt de la santé publique, que les médicaments délivrés soient conformes à la qualité requise dans le dossier d'autorisation sur le marché.

BIBLIOGRAPHIE :

- [1] **MATHIEU S., DEL CERRO C., NOTIS M-H, 1996**, Gérer et assurer la qualité, AFNOR, 6^e édition, p.703.
- [2] **PHARMACOPEE EUROPEENNE, 1999**, Essai des endotoxines bactériennes. 3^e Edition, Addendum, p : 43-51.
- [3] **MOULIN M., COQUIREL A., 2002**, Pharmacologie connaissance et pratique, Masson, Paris, P11 - 37.
- [4] **AIACHE J.M, AIACHE S et RENOUX R, 1995**, Initiation à la connaissance des médicaments, Masson, Paris ,2^e édition, p.24.
- [5] **LECHAT P, 2007**, Pharmacologie, Edition CHU-PS, paris 65,75, 76.
- [6] **AM. CHAUVEL, 1996**, Méthodes et outils pour améliorer la qualité de votre organisation ; Dunod Paris, 30.
- [7] **D. GIRON, 1988**, Influence de la qualité des matières premières sur la vitesse de dissolution et la biodisponibilité, S.T.P. Pharma 4, p, 330-340.
- [8] **TOUITOU Y., 1995**, Pharmacologie, Masson, Paris, 7^{eme} édition, P 24-25,280-296.
- [9] **MULLER., BERGHAUS G, 1978**, The role of platelets, leukocytes and complement in the activation of intravascular coagulation by endotoxin, Raven press, New York, p.20-30.
- [10] **Règles de Bonnes Pratiques de Fabrication de médicaments en petites quantités, Ph. Helv. 2009.** p. 93-108.
- [11] **LE HIR A, 1997**, Pharmacie galénique Bonnes pratiques de fabrication des médicaments Masson éditeur, France,P35-39.
- [12] **KOPP-KUBEL S, 1998**, Good Manufacturing Practices (GMP) in Pharmaceutical Production. OMS Genève,P45-47.
- [13] **LANET j,1991**, La qualité pharmaceutique. Association M.E.R.I Editions de santé,p23
- [14] **CHAMPE C.P., HARVEY A.R et MYCEK J.M, 2000**, Pharmacology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2^{eme} édition, P 04-16.
- [15] **Bonnes pratiques de fabrication, A.f.d.s.s.d.p.santé, Editor. 2009:** Paris
- [16] **DE LORME ph. Vigreux c, 1989**, Plan de formation du personnel méthodologie d'élaboration. Rapport d'une commission SFSTP. S.T.P Pharma Pratiques, p,580- 585.
- [17] **PERROT, A, 2005**, Hygiène des soins, Association Romande des Agents Techniques Hospitaliers.
- [18] **THEVENIN J.M, 1991**, Formation continue. Rapport d'une commission SFSTP STP Pharma Pratiques p 363- 366.
- [19] **IGOR G., MATTIASSON B.O, 2008**, Smart polymers Applications in Biotechnology and Biomedicine,CRC Press, New york, 2^{eme} édition, p 148-150 et 166.

- [20] **SADEGHUPOUR, F, 2005**, La préparation des médicaments parentéraux à l'hôpital - Hottes à flux d'air laminaire, in Séminaire DESS en pharmacie hospitalière ,P ,133-139.
- [21] **BONNABRY, P., F. Sadeghipour, and V. Herrera, 2010**, Maîtrise de la fabrication aseptique en milieu hospitalier, 8e édition. Pharmacie des HUG, Genève P : 122-127.
- [22] **Eudralex, 2009**, EU Guidelines to Good Manufacturing Practice: Medicinal Products for Human and Veterinary Use p22-30.
- [23] **POUPOT B, 1989**, Suivi sanitaire du personnel S.T.P Pharma Pratiques5,P.98- 105.
- [24] **Bonnes pratiques de pharmacie hospitalière (BPPH), 2001**, Ligne directrice particulière pour la préparation des dispositifs médicaux stériles, p. 36-50.
- [25] **TRISSEL, L.A, 2005**, Using a medium-fill simulation to evaluate the microbial contamination rate for USP medium-risk-level compounding. American journal of health-system pharmacy : AJHP ,p. 285-288.
- [26] **Mode d'emploi - Milieux en flacons prêts à l'emploi. 2008**, Diagnostic Systems TSB.
- [27] **HAYS A., KARLESKIND A, 1990**, Sous-traitance de laboratoire analytique : du dossier pharmaceutique au contrôle de routine. S.T.P. Pharma Pratiques, p,251- 256.
- [28] **LE HIR A, 1988**, Evolution de la maîtrise qualité dans l'industrie du médicament. Conception moderne du contrôle. S.T.P Pharma Pratiques, p.44- 50.
- [29] **NACCACHE A, Detoc S, 2000**, Auto-inspection, audit qualité interne, auto évaluation. Différences et similitudes. S.T.P Pharma Pratiques, p.3-12.
- [30] **D. FROMENTIN, J. BRUN et J. LENGART, 1998**, Santé et assurance Qualité P.98-102.
- [31] **Organisation Mondiale de la Santé, 1986**, Accelerated stability studies of widely used pharmaceutical substances under simulated tropical conditions, Genève,p.22
- [32] **PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 6.0 chapitre 5.1.4**. Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques, p .567-569
- [33] **Recommandations en matière de techniques de stérilisation, 1993**, Conseil Supérieur d'Hygiène., nr°7848.
- [34] **Matériaux et systèmes d'emballages pour les dispositifs médicaux devant être stérilisés , 1999**, - Partie 6: NBN EN 868-6.
- [35] **REEVES PETER, 1995**, Role of O antigen variation in the immune response. Trends in Microbiology, P.81-86
- [36] **PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 6.6 chapitre 5.1.3**. Efficacité de la Conservation antimicrobienne, p.5447-5448.
- [37] **CUQ (J.-L.), 1993**, Les méthodes modernes d'analyse rapide en microbiologie Alimentaire. Agro-Alimentaire Information (9), CDIUPA.
- [38] **Williams Kevin, 2001**, Endotoxins pyrogens, « LAL testing ,and depyrognation »,second edition Drugs and pharmaceutical sciences ,James Swarbrick Ed, volume 111,P.29-36.

- [39] **LEVIN J, 1987**, The limulus amoebocyte lysate test perspectives and problems. Detection of bacterial endotoxines with the limulus amoebocytes lysate test. New York, Alan R Liss, p.1-23
- [40] **AKERS MJ, 1984**, « pyrogen testing in parenteral quality control sterility, pyrogen, particule and package integrity testing ». Third Edition.
- [41] **FRIBERGER P, 1987**, A new method of endotoxin determination. American clin. Products, p.12-17.
- [42] **DIATTA H.W, 2003**, Validation des méthodes de contrôle microbiologique de Différents médicaments antifongiques. Thèse Pharm., Dakar, n°8.
- [43] **RAMOND B., GAILLANDRE A, GIBELIN N., MAIGNAN C, 2002, NABETP.** Guide de validation des méthodes de dosage biologique. STP Pharma Pratiques, P.2-19.
- [44] **KADIS S., WEINENBAUM G. et al, 1971**, Microbial toxins, (5), bacterial endotoxins. Academic press, New york, pages 507.
- [45] **SCHAECHTER, MEDOFF, EISENSTEIN, 1999**, Microbiologie et pathologie Infectieuse. De Boeck- université, p.171-175.
- [46] **GREFF-MIRGUET.G, 2002**, Echantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air. Cahier de notes documentaires- hygiène et sécurité du travail- N°187. INRS, p.73-83.
- [47] **TRAORE H, 2004**, Droites de régression et validation du dosage microbiologique de médicaments antibiotiques et antifongiques. Thèse Pharm., Dakar, n°58.
- [48] **LECLERE H., GAILLARD J.L et SIMONET M., 1995**, Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien, Doin, Paris, P 505 et 507.
- [49] **PETAT (E.) et col, 1996**, Les méthodes alternatives de contrôle microbiologique. Présentation des principales techniques rapides. Rapport d'une commission SFSTP. STP Pharma Pratiques, p. 281-301.
- [50] **PETAT (E.) et col, 1999**, Les méthodes alternatives de contrôle microbiologique II. Présentation des travaux réalisés. Rapport d'une commission SFSTP. STP Pharma Pratiques, p.5-44.
- [51] **LANVIN G, 2002**, Essai des endotoxines bactériennes. DESS Contrôle Qualité des produits de Santé – ULP Strasbourg. Aventis pharma, France, p.1-47.
- [52] **EUZEBY J.P, Janvier 2004**, Lipopolysaccharides (antigènes O et endotoxines). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire, p.1-5.
- [53] **SOW A.M, 1996**, Electrophorétypes des lipopolysaccharides de souches de bacilles à Gram négatif. Interet de l'étude de la virulence et de la résistance aux antibiotiques Thèse Pharm., Dakar, n°33.

■ *Annexe II : La composition des milieux de cultures*

● **Bouillon au thioglycolate**

- Tryptone	15g
- Extrait autolytique de levure	5g
- Glucose	5,5g
- Chlorure de sodium	2,5g
- Thioglycolate de sodium	0,5g
- L-cystine	0,5g
- Résazurine	1mg
- Agar agar	0,75g

● **Gélose de Mac Conkey**

- Peptone pancréatique de gélatine	17g
- Tryptone	1,5g
- Peptone pepsique de viande	1,5g
- Lactose	10g
- Sels biliaires	1,5g
- Chlorure de sodium	5g
- Rouge neutre	30mg
- Cristal violet	1mg
- Agar agar	13,5g
- Eau	1000ml

● **Caséine soja Gélose**

- Tryptone	15g
- Peptone papainique de soja	5g
- Sodium chlorure	5g
- Agar	15g
- Eau distillée	15 g

● **Chloramphénicol Gélose**

- Extrait de levure	5,0g
- Glucose	20.0g

- Chloramphénicol 0.1g
- Agar 12.0g

- **Solution tampon péptonée au chlorure de sodium PH 07**
 - Phosphate monopotassique 3,6 g
 - Phosphate disodique dihydraté 7,2 g
 - Chlorure de sodium 4,3 g
 - Peptone de viande ou de caséine 1,0 g
 - Eau purifiée 1000 mL

- **Milieu liquide aux peptones de caséine et de soja**
 - Peptone pancréatique de caséine 17,0 g
 - Peptone papaique de soja 3,0 g
 - Chlorure de sodium 5,0 g
 - Phosphate dipotassique 2,5 g
 - Glucose monohydraté 2,5 g
 - Eau purifiée 1000 mL

- **Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja**
 - Peptone pancréatique de caséine 15,0 g
 - Peptone papaique de soja 5,0 g
 - Chlorure de sodium 5,0 g
 - Gélose 15,0 g
 - Eau purifiée 1000 mL

- **Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé**
 - Dextrose 40,0 g
 - peptone pancréatique de caséine 10,0 g
 - Gélose 15,0 g
 - Eau purifiée 1000 mL
 - Mélange de peptone peptique de tissu animal

- **Milieu liquide de MacConkey**
 - Hydrolysate pancréatique de gélatine 20,0 g
 - Lactose monohydraté 10,0 g
 - Bile de boeuf déshydratée 5,0 g
 - Pourpre de bromocrésol 10 mg
 - Eau purifiée 1000 mL

- **Milieu gélosé de MacConkey**

- Hydrolysate pancréatique de gélatine	17,0 g
- Peptones de viande et de caséine	3,0 g
- Lactose monohydraté	10,0 g
- Chlorure de sodium	5,0 g
- Sels biliaires	1,5 g
- Gélose	13,5 g
- Rouge neutre	30,0 mg
- Violet cristallisé	1 mg
- Eau purifiée	1000 mL

- **Milieu renforcé pour clostridies**

- Extrait de viande de boeuf	10,0 g
- Peptone	10,0 g
- Extrait de levure	3,0 g
- Amidon soluble	1,0 g
- Glucose monohydraté	5,0 g
- Chlorhydrate de cystéine	0,5 g
- Chlorure de sodium	5,0 g
- Acétate de sodium	3,0 g
- Gélose	0,5 g
- Eau purifiée	1000 mL