

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



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



Mémoire

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

Par : BENHAFED Hibaterrahmane

Thème

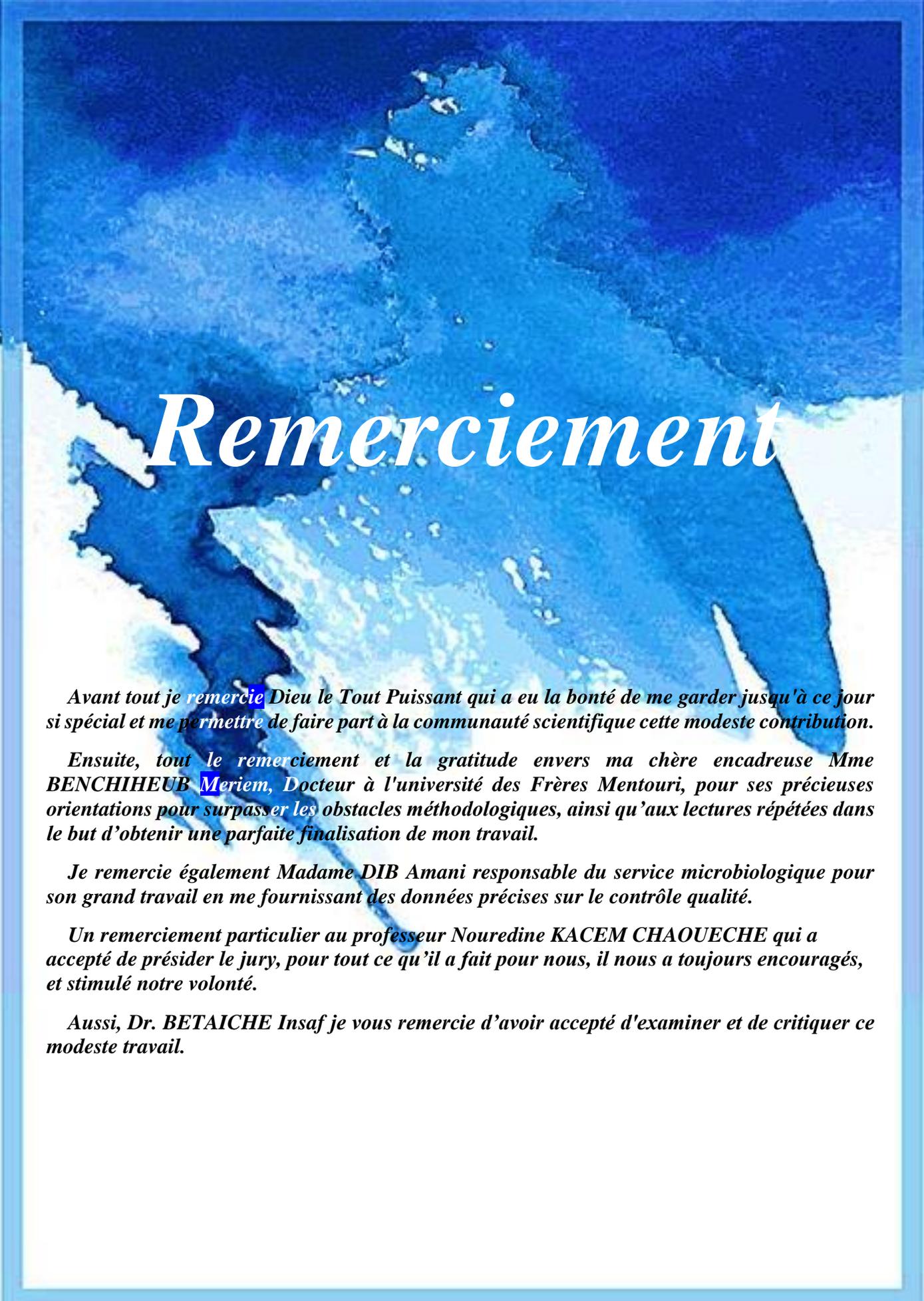
**Validation des milieux de culture dans
le laboratoire pharmaceutique UPC**

Jury d'évaluation :

Président : Mr.KACEM CHAOUECHE Nouredine	UFM. Constantine 1.
Rapporteur : Mme. BENCHIHEUB Meriem	UFM. Constantine 1.
Examineur : Mme. BATAICHE Insaf	UFM. Constantine 1.
Maitre de stage : Mme.DIB Amani	Responsable service de microbiologie UPC

ANNEE UNIVERSITAIRE 2019-2020

*Validation des milieux de
culture dans le laboratoire
pharmaceutique UPC*



Remerciement

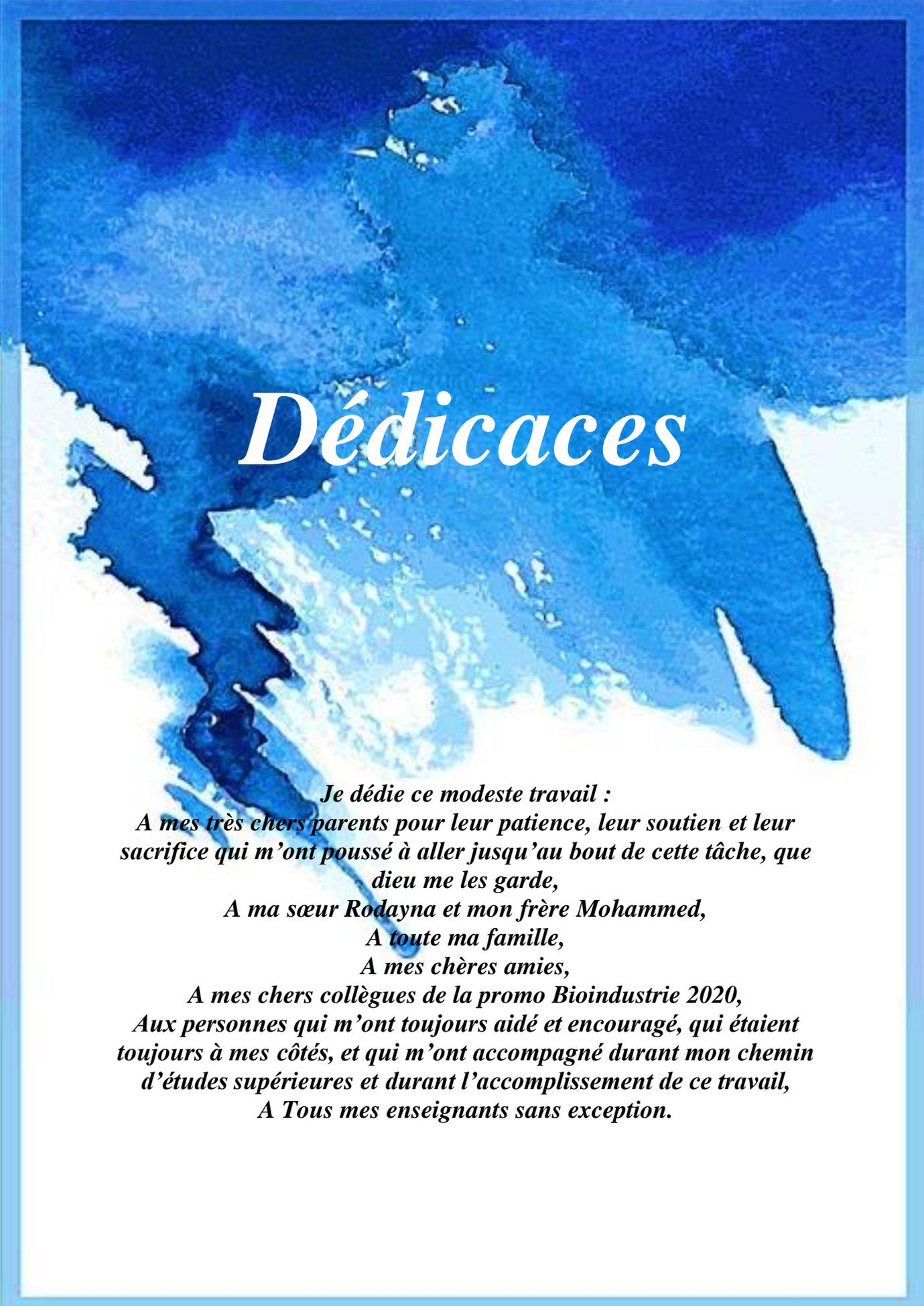
Avant tout je remercie Dieu le Tout Puissant qui a eu la bonté de me garder jusqu'à ce jour si spécial et me permettre de faire part à la communauté scientifique cette modeste contribution.

Ensuite, tout le remerciement et la gratitude envers ma chère encadreuse Mme BENCHIHEUB Meriem, Docteur à l'université des Frères Mentouri, pour ses précieuses orientations pour surpasser les obstacles méthodologiques, ainsi qu'aux lectures répétées dans le but d'obtenir une parfaite finalisation de mon travail.

Je remercie également Madame DIB Amani responsable du service microbiologique pour son grand travail en me fournissant des données précises sur le contrôle qualité.

Un remerciement particulier au professeur Nouredine KACEM CHAOUECHE qui a accepté de présider le jury, pour tout ce qu'il a fait pour nous, il nous a toujours encouragés, et stimulé notre volonté.

Aussi, Dr. BETAICHE Insaf je vous remercie d'avoir accepté d'examiner et de critiquer ce modeste travail.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :
A mes très chers parents pour leur patience, leur soutien et leur sacrifice qui m'ont poussé à aller jusqu'au bout de cette tâche, que dieu me les garde,
A ma sœur Rodayna et mon frère Mohammed,
A toute ma famille,
A mes chères amies,
A mes chers collègues de la promo Bioindustrie 2020,
Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études supérieures et durant l'accomplissement de ce travail,
A Tous mes enseignants sans exception.

Liste des abréviations

ISO : Organisation Internationale de Normalisation.

UPC : Union Pharmaceutique Constantinoise.

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide.

BHIB : Brain Heart Infusion Broth.

BGN : Bacilles Gram Négatif.

BGP : Bacilles Gram Positif.

EPA : Eau Peptonée Alcaline.

BGT : Bouillon Glucosé Tamponné.

TGV : Transport des Germes Vivants.

TSI : milieu

VF : milieu Viande Foie.

FDA : Food and Drug Administration.

EMA : European Medicine Agency.

ATCC : American Type Culture Collection.

MCA : MacConkey Agar.

TSA : Tryptic Soja Agar.

TSB : Tryptic Soja Broth.

SAB : Sabouraud agar.

VRBG : Violet Red Bile Glucose *Agar*.

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication.

EPI : Equipement de Protection Individuelle.

GN : Gélose Nutritive.

UFC : Unité Formant Colonie.

LNCPP : Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques.

Liste des figures

Figure 1 : Milieux de culture bactériologiques	3
Figure 2 : Différentes cultures microbiennes prélevées d'une surface	4
Figure 3 : Technique des 4 quadrants	10
Figure 4 : Union pharmaceutique constantinoise et son logo	16
Figure 5 : Dissolution du milieu déshydraté	24
Figure 6 : Répartition des milieux de culture dans des flacons étiquetés, 1 : milieux liquides ; 2 : milieu gélosé	25
Figure 7 : Souche pure d' <i>Escherichia coli</i> mise dans un cryotube	27
Figure 8 : Etapes de repiquage des souches	28
Figure 9 : Technique des dilutions décimales	31
Figure 10 : Etapes de préparation des dilutions	31-32
Figure 11 : Etapes d'ensemencement sur la gélose nutritive	33
Figure 12 : Comptage de colonies sur la gélose nutritive	34
Figure 13 : Etapes de validation des milieux	13
Figure 14 : Croissance d' <i>E.coli</i> sur la gélose MacConkey	38
Figure 15 : Comparaison entre un bouillon de soja tryptique témoin :1 et un autre ensemencé :2	39
Figure 16 : Croissance d' <i>E.coli</i> sur la VRBG	41
Figure 17 : Croissance de la bactérie <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Chapman	42
Figure 18 : Croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur la gélose cétrimide	43

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition du milieu gélosé MacConkey	20
Tableau 2 : Composition du bouillon de soja tryptique	21
Tableau 3 : Composition du milieu gélosé Sabouraud.	21
Tableau 4 : Composition de la gélose à la bile-violet-rouge avec glucose	22
Tableau 5 : Composition du milieu gélosé mannitol sel	22
Tableau 6 : Composition du milieu gélosé cétrimide	23
Tableau 7 : Masse des milieux déshydratés en gramme nécessaire pour la dilution dans 1L d'eau purifiée	23
Tableau 8 : pH approprié pour chaque milieu de culture étudié	24
Tableau 9 : Temps et température nécessaires pour l'incubation des souches microbiennes	27
Tableau 10 : Conditions d'incubation spécifiques pour chaque souche	33
Tableau 11 : conditions d'incubation des souches de référence ensemencées sur les milieux validés	34
Tableau 12 : Choix de l'unité formant colonie de chaque souche	36
Tableau 13 : Propriétés des milieux de culture validés	37
Tableau 14 : Interprétation du facteur de deux	37
Tableau 15 : Résultat du test de fertilité du milieu MacConkey	38
Tableau 16 : Résultat du test de fertilité du bouillon de soja tryptique	39
Tableau 17 : Résultats du test de fertilité de la gélose Sabouraud	40
Tableau 18 : Résultats de test de fertilité du milieu gélosé à la bile-violet-rouge avec gl. . .	41
Tableau 19 : Résultats du test de fertilité du milieu mannitol sel	42
Tableau 20 : Résultats du test de fertilité du milieu gélosé au cétrimide	43

Table des matières

Remerciement et dédicaces

Listes des abréviations

Listes des figures

Listes des tableaux

Table des matières

Introduction	1
<u>Chapitre 1 : Revue bibliographique</u>	3
1. Milieux de culture	3
1.1. Constituants communs des milieux de culture	3
1.1.1. Nutriments	3
1.1.2. Substances plus ou moins facultatives	4
1.2. Culture microbienne	4
1.2.1. Définitions	4
1.2.2. Facteurs environnementaux dans les milieux de culture	5
1.3. Classification des milieux de culture	6
1.3.1. Classification selon la composition	6
1.3.2. Classification selon la consistance	7
1.3.3. Classification selon l'utilisation	7
1.3.4. Classification selon le mode de stérilisation	9
1.4. Présentation des milieux de culture	9
1.5.1. Milieux déshydratés	9
1.5.2. Milieux solides	9
1.5.3. Milieux liquides	9
1.5. Ensemencement et techniques d'ensemencement	10
1.5.1. Ensemencement sur un milieu solide	10
1.5.2. Ensemencement sur un milieu liquide	11
2. Processus de validation des milieux de culture	11
1.1. Définition	12
1.2. Histoire	12
1.3. Validation dans l'industrie pharmaceutique	12
1.4. Processus de validation des milieux de culture	13
1.4.1. Test de Stérilité	13
1.4.2. Test de Fertilité	14
<u>Chapitre 2 : Matériel et Méthodes.</u>	16
1. Présentation de l'Organisme d'Accueil UPC	16
2. Matériel et équipement	18
2.2. Equipement de protection individuelle (EPI)	18
2.3. Souches Microbienne Utilisées pour la Validation	19
2.3.1. <i>E.coli</i>	19
2.3.2. <i>S.aureus</i>	19
2.3.3. <i>P.aeruginosa</i>	19
2.3.4. <i>B.pumilus</i>	19
2.3.5. <i>A.brasiliensis</i>	19
2.3.6. <i>C.albicans</i>	19
2.4. Produits à étudier : Milieux de Culture	19
2.4.1. Gélose Mac Conckey	19
2.4.2. Milieu liquide de soja tryptique	20

2.4.3.	Gélose Sabouraud	21
2.4.4.	Gélose à la bile-violet-rouge avec glucose	21
2.4.5.	Gélose mannitol-sel	22
2.4.6.	Gélose cetrimide	22
3.	Protocole de la validation microbiologique des milieux de culture dans l'industrie pharmaceutique	23
3.1.	Préparation des milieux de culture	23
3.2.	Calibrage des souches microbiennes	26
3.2.1.	Souches de contrôle de référence	26
3.2.2.	Choix des souches de contrôle	26
3.2.3.	Conservation des souches de contrôle	26
3.2.4.	Protocole de calibrage des souches microbiennes	26
3.3.	Validation des milieux de culture	33
Chapitre 3 : Résultats et interprétation		36
1.	Test de stérilité	36
2.	Test de fertilité	36
2.1.	Calibrage des souches microbiennes	36
2.2.	Vérification des performances	37
2.2.1.	Gélose Mac Conckey	38
2.2.2.	Milieu liquide de soja tryptique	39
2.2.3.	Gélose Sabouraud	40
2.2.4.	Gélose à la bile-violet-rouge avec glucose	40
2.2.5.	Gélose mannitol-sel	41
2.2.6.	Gélose cetrimide	43
Conclusion		45
Références bibliographiques		
Annexes		
Résumé		
الملخص		
Abstract		



Introduction

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

Pour que la conformité d'un médicament soit assurée, il faut réaliser un ensemble de tests lors de son élaboration dans le cadre du contrôle de qualité afin de fabriquer un produit sous l'exigence des normes de l'assurance qualité pharmaceutique, dont entre eux le contrôle microbiologique qui s'appuie sur l'utilisation massive de plusieurs milieux de culture

Dans les laboratoires pratiquant des examens microbiologiques, les principaux objectifs sont la conservation, la revivification, la croissance, la recherche et/ou le dénombrement d'une grande variété de micro-organismes. Les milieux de culture sont utilisés dans toutes les méthodes de culture microbiologique traditionnelles comme dans de nombreuses autres méthodes alternatives (**ISO 11333**).

La validation des milieux de culture constitue une étape essentielle dans leur contrôle de qualité. De nombreux essais et modes opératoires dépendent de l'aptitude des milieux de culture à donner des résultats homogènes et reproductibles. Les exigences relatives aux milieux peuvent être spécifiques à la fois à l'échantillon et aux souches à rechercher. Des milieux de culture satisfaisant à des critères de performance établis constituent donc un préalable à toute analyse microbiologique fiable. Notre travail s'inscrit dans cette optique. Il convient d'effectuer un nombre suffisant d'essais afin de démontrer

- a) que chaque lot de milieu est acceptable,
- b) que le milieu répond aux besoins et
- c) que le milieu peut donner des résultats homogènes.

Ces trois critères constituent une part essentielle des procédures internes de contrôle qualité et, avec la documentation appropriée, permettent une surveillance efficace des milieux de culture, contribuant ainsi à l'obtention de données exactes et fiables. Pour une analyse microbiologique fiable, il est essentiel d'utiliser des milieux de culture de qualité reconnue. Il est recommandé, pour la détermination des caractéristiques de performance d'un milieu de culture, de procéder à des essais conformes à la présente Norme internationale.

Il convient que l'établissement de critères de performance minimaux largement acceptés pour les milieux conduise à des produits de qualité plus homogène, et réduise le nombre d'analyses supplémentaires dans les laboratoires où ils sont utilisés.

En outre, les critères d'acceptation mesurés selon des méthodes définies dans la présente Norme internationale peuvent être utilisés par tous les laboratoires de microbiologie pour évaluer le caractère productif, sélectif et/ou électif d'un milieu de culture (**ISO 11333**).

Dans le présent travail, nous avons repartis notre démarche en trois parties :

La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique dont on a commencé en 1^{er} lieu par des généralités sur les milieux de cultures, en 2^{ème} lieu nous présentons la méthode de validation des milieux de culture dans l'industrie pharmaceutique.

La deuxième partie « Matériel et méthodes », dans lequel nous présenterons le matériel utilisé dans cette étude ainsi que le travail réalisé durant la période du stage au sein du laboratoire pharmaceutique UPC, et pour ce faire, nous citerons les différents protocoles effectués pour la validation proposée dans cette étude sur les paramètres suivants : la linéarité, l'exactitude, la fidélité, la spécificité et la sélectivité.

Le troisième est intitulé « Résultats et discussion », réservée à la présentation des différents résultats obtenus avec leurs discussions. En s'appuyant sur la Pharmacopée européenne 8.0^{ème} édition et le Dossier technique.



Chapitre 1 :
Revue Bibliographique

1. Milieux de culture

Le milieu de culture est un mélange de substances, sous forme liquide, semi-solide ou solide, qui contient des constituants naturels et/ou synthétiques permettant la croissance des micro-organismes (avec ou sans inhibition de certains d'entre eux), leur identification ou leur conservation (**ISO 11333**).



Figure 1 : Milieux de culture bactériologiques.

1.1. Constituants communs des milieux de culture

Les formulations des milieux sont développées sur la capacité des bactéries à utiliser les composants des milieux.

Un milieu de culture, constitué à partir des substances biologiques ou chimiques, reproduit un environnement favorable (nutriment, pH, pression osmotique...) à la culture d'un certain type de microorganismes (**Zimbro et al., 2009**) :

1.1.1. Nutriments

- **L'eau purifiée** est recommandée pour la préparation des milieux de culture. Il ne contient aucune substance ajoutée.
- **La peptone, les hydrolysats de protéines, les infusions et les extraits** sont les principales sources d'azote et de vitamines dans les milieux de culture. Les peptones sont des ingrédients solubles dans l'eau dérivés de protéines par hydrolyse ou digestion de la matière source ; par exemple, viande, lait.
- **Les glucides** sont utilisés dans les milieux de culture comme sources d'énergie et peuvent être utilisés pour différencier les genres et identifier les espèces.

1.1.2. Substances plus ou moins facultatives

- **Les tampons** maintiennent le pH des milieux de culture.
- **Les agents sélectifs** comprennent les sels biliaires, les colorants et les agents antimicrobiens. Les sels biliaires et le désoxycholate sont sélectifs pour l'isolement des micro-organismes à Gram négatif, inhibant les cocci à Gram positif.
- **Les colorants et les indicateurs** sont essentiels dans la préparation de milieux de culture différentiels et sélectifs. Dans ces formulations, les colorants agissent comme des agents bactériostatiques ou des indicateurs de changements d'acidité ou d'alcalinité du substrat.
- **Les agents antimicrobiens** sont utilisés dans les milieux pour inhiber la croissance des bactéries, des levures et des champignons.
- **Des agents solidifiants**, dont la gélose, la gélatine et l'albumine, peuvent être ajoutés à un milieu liquide afin de changer la consistance en un état solide ou semi-solide.
- **Les chromogènes et les fluorogènes** sont des substrats incorporés dans les milieux de culture pour permettre la différenciation et l'identification des organismes. Lorsque ces substrats sont dégradés par des enzymes spécifiques, ils libèrent des composés de couleur ou fluorescents différents. Un exemple de ce dernier est le 4-méthylumbelliféryl β -D-glucuronide ou MUG (Zimbro et al., 2009).

1.2. Culture microbienne

1.2.1. Définitions

En biologie, la **culture cellulaire** désigne un ensemble de techniques utilisés pour faire croître des cellules hors de leur organisme (ex : vivo) ou de leur milieu d'origine, dans un but d'expérimentation scientifique [1].



Figure 2 : Différentes cultures microbiennes prélevées d'une surface.

- **Culture microbienne**

La culture microbienne est un ensemencement de microbes par application d'une méthode spécifique [2].

- **Culture mère**

Une culture mère est une subculture primaire obtenue à partir d'un stock de référence (**ISO 11333**).

- **Stock de référence**

Le stock de référence est un ensemble de cultures identiques distinctes obtenues au laboratoire à partir d'une subculture de la souche de référence préparée au laboratoire ou obtenue auprès d'un fournisseur (**ISO 11333**).

- **Souche de référence**

La souche de référence est un micro-organisme obtenu directement auprès d'une collection officielle de cultures, défini au moins par son genre et son espèce, classé et décrit selon ses caractères et issu, de préférence, de produits alimentaires ou d'eau, selon le cas échéant (**ISO 11333**).

1.2.2. Facteurs environnementaux dans les milieux

La culture de micro-organismes sur des milieux de culture dépend d'un certain nombre de facteurs importants, notamment une gamme optimale de nutriments, d'oxygène ou d'autres gaz, l'humidité, le pH et la température. Les nutriments importants comprennent les sources de carbone, d'azote, phosphates inorganiques et soufre, métaux traces, eau et vitamines.

Chaque nutriment est, dans diverses combinaisons, un ingrédient clé des milieux de culture microbiologiques. Les nutriments fonctionnent comme des « facteurs de croissance ». Un facteur de croissance est une substance naturelle, comme un acide aminé, qui est capable de stimuler la croissance cellulaire, la prolifération et la différenciation cellulaire (**Sandle, 2016**).

- **L'Atmosphère**

La plupart des bactéries sont capables de se développer dans des conditions ordinaires de tension d'oxygène. Les aérobies obligatoires nécessitent l'admission gratuite d'oxygène, tandis que les anaérobies ne se développent qu'en l'absence d'oxygène atmosphérique. Entre ces deux groupes se trouvent les micros aérophiles, qui se développent mieux dans des conditions

anaérobies partielles, et les anaérobies facultatifs, qui sont capables de croître en présence ou en absence d'oxygène.

De nombreux micro-organismes nécessitent un environnement de 5 à 10% de CO₂. Des niveaux supérieurs à 10% sont souvent inhibiteurs en raison d'une diminution du pH lors de la formation d'acide carbonique (Zimbro *et al.*, 2009).

- **Activité de l'eau**

Des conditions d'humidité appropriées sont nécessaires pour une croissance luxuriante continue des micro-organismes. Les organismes nécessitent un environnement aqueux et doivent avoir de l'eau « libre ». L'eau « libre » n'est pas liée dans une structure complexe et est nécessaire au transfert de nutriments et de déchets toxiques. L'évaporation pendant l'incubation ou le stockage entraîne une perte d'eau « libre » et une réduction de la taille des colonies ou une inhibition totale de la croissance de l'organisme (Zimbro *et al.*, 2009).

- **Agents protecteurs et facteurs de croissance**

Le carbonate de calcium, l'amidon soluble et le charbon de bois sont des exemples d'agents protecteurs utilisés dans les milieux de culture pour neutraliser et absorber les métabolites toxiques produits par la croissance bactérienne.

Le nicotinamide adénine dinucléotide, le NAD (facteur V) et l'hémine (facteur X) sont des facteurs de croissance requis par certaines bactéries (Zimbro *et al.*, 2009).

- **Température**

La température est un autre paramètre important : les bactéries et les champignons mésophiles ont une croissance optimale à des températures de 25 à 40° C ; les organismes thermophiles ne se développent qu'à des températures supérieures à 45° C ; les organismes psychrophiles (« amoureux du froid ») nécessitent des températures inférieures à 20° C. Les organismes pathogènes humains sont généralement mésophiles (Zimbro *et al.*, 2009).

- **pH**

Le milieu doit avoir un pH approprié.

1.3. Classification des Milieux de Culture

1.3.1. Classification selon la Composition

Il existe différentes classifications des milieux de culture [3] :

a) Milieu complexe empirique (naturel)

La composition de ce milieu n'est pas bien définie, c'est le milieu naturel de la bactérie.

On retrouve des extraits de viande, des extraits de levure, les peptones. Exemple : Milieu cœur cervelle BHIB (Brain Heart Infusion Broth).

b) Milieu semi-synthétique

Ou milieu complexe, des substances chimiques bien définies sont rajoutées, ceci concerne les produits ayant un intérêt pour la bactérie, comme les facteurs de croissance, Exemple : Gélose enrichie au sang de mouton.

c) Milieu synthétique

La composition est parfaitement définie tant en quantité qu'en qualité,

Ce sont des milieux utilisés dans la mise en évidence d'une réaction enzymatique précise, Exemple : Milieu de Ferguson.

1.3.2. Classification selon la consistance

a) Milieu liquide

Exemple : Milieu de Clark et Lubs, Bouillon d'enrichissement.

b) Milieu solide ou gélosé

C'est un milieu liquide solidifié par addition d'Agar à une concentration de 1 à 1,7%. Exemple : milieu de Chapman.

c) Milieu semi-liquide, semi-solide, ou faiblement gélosé

La concentration en Agar est plus faible que celle du milieu gélosé, elle est comprise entre 0,05-0,075%. Exemple : Milieu Mannitol mobilité, MEVAG.

1.3.3. Classification selon l'utilisation

a) Milieux usuels ou de base

Permettent la culture de bactéries non exigeantes. Exemple : Gélose nutritive et bouillon nutritif.

- **Milieux d'isolement** : c'est le milieu de base (ordinaire).

- **Milieux enrichis** : contiennent les composants indispensables aux bactéries, mais qu'elles ne peuvent synthétiser, on parle de bactéries exigeantes. Exemple : Gélose au sang simple, ou additionnée aux vitamines.
- **Milieux sélectifs** : permettent la pousse d'un seul type bactérien, pour cela on utilise des inhibiteurs pour réprimer les autres genres, ex : Gélose Hektoen qui permet la culture des BGN, bacilles Gram négatifs non exigeants, la gélose contient la bile inhibitrice des BGP.
- **Milieux électifs** : permettent la pousse favorable d'un genre bactérien par rapport aux autres sans leur destruction. Exemple : Eau peptonée alcaline (EPA), dont l'alcalinité favorise la pousse du vibrio (germe responsable du choléra) (préfère un milieu alcalin).

d) Milieux d'enrichissement

Permettent de favoriser une croissance bactérienne à partir du prélèvement paucibacillaire. Il s'agit de milieux liquides riches permettant le développement d'un maximum de bactéries. Exemple : bouillon pour hémoculture.

e) Milieux d'identification

Permettent l'étude du métabolisme biochimique des bactéries. Exemple : Milieu de Ferguson.

f) Milieux de conservation

Selon leur composition, on peut conserver aussi bien les bactéries non exigeantes que les bactéries exigeantes :

- Pour les bactéries non exigeantes, on utilise un milieu solide qui est une gélose profonde en capillaires que l'on conserve à température ambiante.
- Pour les bactéries exigeantes, on utilise un milieu liquide qui est du BGT + Glycérol que l'on congèle à -80°C.

g) Milieux de transport

Il existe plusieurs types en fonction de la bactérie à transporter et de sa fragilité. Exemple : TGV (milieu de transport de germes vivants) milieu au charbon pour les bactéries fragiles (**Annexe**

h) Milieux pour antibiogramme

Exemple : Mueller Hinton simple ou enrichi au sang.

Dont la composition est proche de celle des liquides biologiques, de ce fait l'activité des antibiotiques in vivo est comparable à celle obtenue in vitro après diffusion sur la gélose.

i) Milieux chromogènes ou milieux différentiels

Permettent l'identification directe de certaines espèces bactériennes sans avoir recours à une galerie biochimique ou l'orientation vers certains groupes bactériens. La gélose renferme des substrats incolores dont la dégradation par les enzymes respectives apportées par des bactéries conduit à des colonies colorées.

Exemple : Milieu uriselect (BioMérieux), qui contient de l'urée comme substrat pour l'uréase (enzyme apportée par le proteus)

1.3.4. Classification selon le mode de stérilisation

Il existe deux types de milieux selon le mode de stérilisation.

a) Milieux autoclavables

C'est un milieu de culture dont les composants ne sont pas détruits par la chaleur.

Exemple : milieu gélose nutritive, Mueller Hinton en flacons.

b) Milieux non autoclavables

Ces milieux contiennent des produits labiles pouvant être détruit par la chaleur.

Exemple : Loweinstein-Jensen (cultiver les mycobactéries → Tuberculose).

1.4. Présentation des milieux de culture

1.4.1. Les milieux déshydratés :

- C'est une poudre conditionnée en boîtes de 250 ou 500g.

1.4.2. Les milieux solides :

- Gélose en flacons
- Gélose en boîtes de pétri
- Gélose en tube incliné, ex : Citrate de Simmons.
- Gélose en culot et pente inclinée, ex : TSI
- Gélose profonde, ex : MEVAG
- Gélose profonde en capillaire, ex : VF (viande foie) ou milieu de conservation.

1.4.3. Les milieux liquides :

- Milieux liquides en flacons, ex : Bouillon d'hémoculture.
- Milieux liquides en tubes, ex : BGT.
- Milieux liquides en ampoules, ex : AA (acides aminés) (**Annexe 2**).

1.5. Ensemencement et techniques d'ensemencement

L'ensemencement est l'action de mettre des bactéries sur un milieu de culture stérile. Il doit être effectué dans des conditions d'asepsie rigoureuses à partir d'un prélèvement d'une colonie ou d'un bouillon bactérien. Il peut être réalisé sur un milieu liquide ou solide [3].

1.5.1. Ensemencement sur un milieu solide

a) Milieu en boîte de pétri

Il existe plusieurs techniques d'ensemencement sur boîtes :

- **Isolement ou épuisement**

C'est la technique des 4 quadrants qui consiste à disperser le microorganisme à la surface d'un milieu solide afin d'obtenir des colonies séparées, ainsi permet de retrouver tous les microorganismes d'un mélange, mais aussi de vérifier la pureté d'une souche bactérienne.

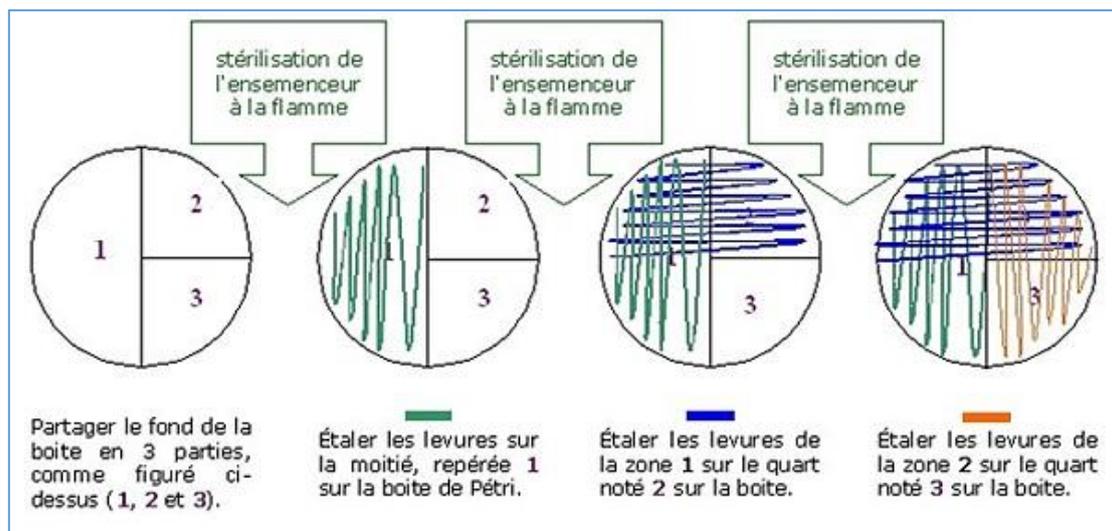


Figure 3 : Technique des 4 quadrants.

- **Beurrage** : c'est une technique d'écouvillonnage qui consiste à réaliser un ensemencement très riche (pour les bactéries exigeantes et fragiles).
- **Antibiogramme** : à partir d'une suspension bactérienne d'une opacité ou densité optique bien définie, on réalise des stries serrées à l'aide d'un écouvillon.
- **Dénombrement** : il s'agit d'un ensemencement par étalement au râteau d'un volume connu d'une suspension bactérienne.

b) Milieu incliné en pente

Pour ce type de milieu, ensemercer toujours du bas en haut par des stries serrées. La culture se traduit par apparition de colonies ou virage de la couleur de l'indicateur pH.

c) Milieu en culot

L'ensemencement se fait par piqure centrale.

d) Milieu en culot + pente

Ensemencer la pente par des stries serrées ensuite culot par piqure centrale, même résultat.

e) Milieu d'ensemencement en masse

Cet ensemencement se réalise en tube ou en boîte. La technique consiste à déposer le produit à analyser (eau ou nutriments) et rajouter la gélose dessus refroidie à 45°C, laisser se solidifier et incubé.

Technique surtout utilisée en bactériologie alimentaire et contrôle des eaux, le lendemain il y aura apparition des colonies lenticulaires à l'intérieure de la gélose.

1.5.2. Ensemencement sur un milieu liquide

On peut ensemercer un milieu liquide :

- Soit à partir d'un produit liquide, on met quelques gouttes dans le milieu à ensemercer avec pipette pasteur,
- Soit à partir d'un produit solide, écraser la colonie prélevée à l'aide d'une anse de platine ou pipette pasteur sur la paroi du tube, pour obtenir une suspension homogène.

2. Processus de validation des milieux de culture

La qualité des milieux de culture utilisés en microbiologie au laboratoire pharmaceutique est cruciale pour obtenir des résultats optimaux et fiables. Certains milieux de culture sont essentiels pour isoler certains microbes, il est donc impératif qu'ils fonctionnent comme prévu.

Les procédures de contrôle de qualité permettent de s'assurer que les milieux n'ont pas été contaminés avant leur utilisation et qu'ils permettent la croissance de l'organisme avec lequel ils ont étéensemencés.

2.1. Définition de la validation

La validation est une approche systématique de collecte et d'analyse de données suffisantes qui donnera une assurance raisonnable (preuves documentées), basée sur un jugement scientifique, qu'un processus, lorsqu'il fonctionne dans des paramètres spécifiés, produira systématiquement des résultats dans des spécifications prédéterminées (**Haider, 2006**).

Action pour vérifier que tout processus, procédure, activité, matériel, système ou équipement utilisé dans la fabrication ou le contrôle peut, atteindra et atteint les résultats souhaités et attendus (**Haider, 2006**).

2.1. Histoire

Depuis le milieu des années 70, la validation est devenue une influence de plus en plus dominante dans la fabrication et l'assurance qualité des produits pharmaceutiques.

Pour leurs industries, la validation est tout d'abord une exigence réglementaire. Bien qu'il n'existe pas de description précise étape par étape, des Guidelines sont publiées par European Medicine Agency (EMA) (**Annexe 1**) en 1976, la Food and Drug Administration (FDA) (**Annexe 1**), ou encore les Pharmacopées pour définir les responsabilités relatives à la validation. C'est pour ça elle était souvent considérée comme un fardeau. Malgré les critiques initiales, la validation est maintenant bien acceptée et considérée comme une partie de la gestion de qualité. Son avenir est d'un grand intérêt, particulièrement avec l'expansion mondiale de la fabrication pharmaceutique et le désir des normes et des exigences internationales harmonisées.

2.2. Validation dans l'industrie pharmaceutique

Afin de valider les contrôles sur les lots de fabrication, il est nécessaire de vérifier la conformité :

- Des milieux : Un contrôle de stérilité et un essai de fertilité sont effectués sur chaque lot de milieu par l'utilisateur.
- Des diluants : généralement un contrôle de qualité de l'eau purifiée
- Des produits à examiner : Les lignes directrices sur les principes généraux de la validation des processus mentionnent quatre types de validation (**Raynaud, 2011**) :

- a) **Validation prospective** : C'est une validation effectuée avant la production de routine de produits destinés à la vente ou sur un produit fabriqué selon un procédé modifié, comportant des modifications importantes pouvant se répercuter sur les caractéristiques du produit.
- b) **Validation rétrospective** : La validation rétrospective est réalisée pour un médicament déjà commercialisé et est définie comme l'établissement de la preuve documentée qu'un système fait ce qu'il prétend faire sur la base des données relatives à la fabrication, aux essais et au contrôle du lot.
- c) **Validation concomitante (ou simultanée)** : C'est une validation réalisée durant la production de routine de produits destinés à la vente qui n'est utilisée qu'à titre exceptionnel et qui doit être justifiée.
- d) **Revalidation** : C'est le renouvellement de la validation du procédé en vue de démontrer que les changements introduits dans le procédé/verrerie conformément aux procédures de maîtrise des changements ne comportent aucun risque pour les caractéristiques du procédé et la qualité du produit.

2.3. Processus de la validation microbiologique des milieux de culture

Les performances de tous les milieux utilisés au laboratoire doivent être vérifiées par des méthodes de contrôle de qualité appropriées. Pour les milieux préparés sur place (au labo), cette évaluation doit être conduite pour chaque lot préparé ; pour ceux disponibles commercialement, la vérification des performances sera réalisée pour chaque nouveau numéro de lot.

Dans tous les cas, les points suivants des milieux préparés sur place ou achetés devraient être soigneusement vérifiés :

2.3.1. Stérilité

La validation de la stérilité des milieux est une opération qui prouve qu'un milieu de culture ne contient pas des microorganismes vivants (forme végétatif et sporulée).

Elle permet de contrôler leur non contamination lors de leur préparation et de leur conservation en les plaçant (milieu prêt à l'emploi donc conditionné en boîte et non ensemencé) à l'étuve pendant le temps et à la température d'incubation utilisés habituellement.

2.3.2. Fertilité

La validation de la fertilité est le contrôle de l'aptitude des milieux de culture à permettre une croissance des germes totaux en nombre défini ; ainsi qu'à la vérification de leur sélectivité vis-à-vis des microorganismes spécifiés.

Elle permet de déterminer si le milieu a conservé les qualités nutritionnelles attendues au cours de sa préparation ou de sa conservation.

Onensemence le milieu avec une suspension bactérienne de référence (ATCC) (**Annexe 1**) de concentration connue de façon à retrouver environ 100 colonies sur le milieu.

L'absence de culture ou un résultat < 50 colonies traduit un problème de fertilité [4]:

- Capacité à permettre la croissance du pathogène cible.
- Capacité à produire des réactions biochimiques appropriées.

a) Capacité à permettre la croissance de l'organisme cible

Pour des milieux sélectifs : utiliser au moins une souche pour tester la capacité à permettre la croissance du pathogène ciblé (par exemple, pour la gélose MacConkey (MCA), une souche de *Shigella* telle que *S. flexneri*). Il faut également noter si cette souche produit les réactions biochimiques ou des couleurs adéquates sur le milieu [4].

b) Capacité à produire des réactions biochimiques appropriées

- Pour des milieux sélectifs : utiliser au moins un pathogène et un non pathogène pour tester la capacité du milieu à faire la distinction entre les organismes ciblés et les organismes en compétition (par exemple, pour MAC, un organisme qui ne fermente pas le lactose tel que *S. flexneri* et un organisme qui le fermente tel que *E. coli*) [4].

- Pour des milieux supports de réactions biochimiques : utiliser au moins un organisme qui produira une réaction positive et au moins un autre avec réaction négative (par exemple, pour le milieu à l'urée, un organisme producteur d'uréase tel que *Proteus* et un organisme non producteur d'uréase tel que *E. coli*).

2.4. Domaine d'application

Cette procédure est applicable pour vérifier la stérilité, la fertilité et la sélectivité de :

- Chaque nouveau lot de milieu de culture à la réception.
- Chaque nouvelle préparation des milieux déshydratés
- Lors d'expertise ou de résultat hors spécifications.

- Lors de la validation d'une méthode d'analyse.
- A l'approche de la date de péremption ou si les conditions de conservation ont présenté accidentellement une défaillance.
- Au changement de caractères organoleptiques du milieu : couleur, odeur, aspect ...



*Chapitre 2 :
Matériel et méthodes*

L'objectif de ce travail s'inscrit sur la validation microbiologique des milieux de culture dans l'industrie pharmaceutique. Ce travail est réalisé au niveau du laboratoire de l'Union Pharmaceutique Constantinoise, et plus précisément le laboratoire de microbiologie.

Le principe de cette étude est de démontrer que la méthode de validation utilisée nous permet de démontrer que chaque lot de milieu est acceptable, que le milieu en question répond aux besoins et que ledit milieu peut donner des résultats homogènes.

1. Présentation de l'organisme d'accueil UPC (Union Pharmaceutique Constantinoise)

UPC (Union Pharmaceutique Constantinoise), Laboratoire pharmaceutique privé Algérien, situé à Constantine exactement à la zone industrielle Palma fondé en 1997 pour répondre spécifiquement au développement du médicament générique, depuis, de grands efforts ont été déployés en matière d'investissements et d'acquisitions de matériels de haute technicité afin d'activer conformément aux normes internationales de : Bonnes Pratique de Fabrication « BPF » .garantissant ainsi des produits de qualité pour répondre à un besoin constamment croissant en médicaments accessibles à tout le monde.



Figure 4 : Union pharmaceutique constantinoise et son logo.

- Ce laboratoire pharmaceutique a trois principales activités :
 - UPC, Unité de Production, Palma.
 - UPC, Importation/ Distribution, Rhumel et Rouiba.
 - UPC, Grossisterie, Rhumel et Rouiba.

- L'industrie produit plusieurs formes et classes thérapeutiques, dont on trouve :
 - **Formes liquides** : 06 millions d'unités /an. (ex : antihistaminique, antitussif, bain de bouche...).
 - **Formes sèches** : « les Secs » 13 millions d'unités/an ; et « les effervescents » 05 millions d'unités /an. (ex : anti-infectieux, antiparkinsonien, protection dermique...).
 - **Forme orale** : « les Hormones » 10 millions d'unités /an.

- Le laboratoire de contrôle qualité contient 2 unités :
 - Service physico-chimique.
 - Service de microbiologie.

Le service de microbiologie est partagé essentiellement en 6 Salles (bureau, laverie, salle de manipulation1, salle d'incubation, salle de manipulation 2, salle de stockage et préparation). Les salles utilisées dans notre étude sont les suivantes :

a) Laverie

C'est une salle spécialisée pour le lavage de verrerie utilisée lors de tout type de manipulation dans ce service, elle est composée essentiellement de :

- Bain Marie : permet de chauffer un récipient dans un bain d'eau.
- Autoclave : vertical pour la stérilisation des milieux de culture qui se fait à 121°C pendant 15 minutes.

b) Salle d'incubation

C'est là où on trouve les différents types d'incubateurs enceinte thermostatée, utilisés pour le contrôle qualité microbiologique.

- Etuve à 32°C : pour mise en culture et développement des souches
- Etuve à 43°C : pour mise en culture et développement de *Escherichia coli* (Température spécifique).
- Etuve à 22,5°C : pour mise en culture et développement des moisissures et levures.

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

- Prévenir en cas de panne ou un dérèglement de température.
- Suivre la température des incubateurs au cours de leur fonctionnement.
 - Etuve de stérilisation : avec une température de 180°C et une durée de 30min.

c) Salle de Manipulation 1

- Compteur de Colonies.
- Agitateur Vortex.
- Hotte à Flux Laminaire : hotte soufflante conçue pour éviter la contamination.
- Microscope.
- Bec Bensen.

d) Salle de stockage et préparation des milieux de culture

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

- Balance Electronique.
- Agitateur Magnétique Chauffant.
- pH Mètre.
- Frigo (2-8°C).
- Congélateur (-20°C).

2. Matériel et équipement

1.1. Equipement de protection individuelle (EPI)

A l'entrée du service microbiologie, un pictogramme est appliqué sur une fiche qui participe à la signalisation de santé et de sécurité des opérateurs du laboratoire.

La portée des EPI est obligatoire :

- Sur chaussures ;
- Charlottes ;
- Sur blouse ;
- Gants ;
- Lunettes de sécurité.

1.2. Souche microbiennes utilisées pour la validation

1.2.1. *Escherichia coli*

Bacille à gram négatif de la famille des entérobactéries. On la trouve dans les intestins des humains et des animaux (SOMIPEV, 2017).

1.2.2. *Staphylococcus aureus*

Des cocci à gram positif, commensales de l'homme et se révèlent pathogènes opportuniste dans certains emplacements ou dans certaines circonstances (SOMIPEV, 2017).

1.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Bacille à gram négatif, aérobic strict, ubiquiste, c'est un pathogène opportuniste responsable fréquemment des infections nosocomiales (SOMIPEV, 2017).

1.2.4. *Bacillus pumilus*

Une espèce bactérienne Gram positive et sporulant que l'on trouve couramment dans le sol (SOMIPEV, 2017).

1.2.5. *Aspergillus brasiliensis*

Elle réfère le monde des moisissures, elle est isolée dans des substrats variés comme : sol, bois, eau, légumes, fruits, noix, poussières, plastiques, cuir, métaux, textile. Elle produit des spores noires [5].

1.2.6. *Candida albicans*

Elle représente le monde des levures et -elle est un agent pathogène fongique opportuniste responsable de la candidose chez l'hôte humain [5].

1.3. Produits à étudier : Milieux de culture

Les milieux de culture suivants se sont avérés satisfaisants pour la réalisation des essais de contamination microbienne prescrits dans la pharmacopée européenne.

1.3.1. Milieu gélosé de MacConkey (MCA)

Le MacConkey Agar (MAC) est un milieu sélectif et différentiel conçu pour isoler les bactéries entériques Gram-négatives comme *Escherichia coli* dans les eaux, les produits alimentaires, les produits pharmaceutiques et biologiques d'origine animale ; et pour les différencier en fonction de leur capacité à fermenter le lactose.

L'hydrolysate pancréatique de gélatine et les peptones (viande et caséine) fournissent les nutriments essentiels, les vitamines et les facteurs azotés nécessaires à la croissance des micro-organismes. Le lactose monohydraté est la source fermentescible de glucides. L'action sélective de ce milieu est attribuée au cristal violet et aux sels biliaires, qui inhibent la plupart des espèces de bactéries à Gram positif. Le chlorure de sodium maintient l'équilibre osmotique dans le milieu. Le rouge neutre est un indicateur de pH qui vire au rouge à un pH inférieur à 6,8 et est incolore à tout pH supérieur à 6,8 [6].

Ce tableau suivant montre sa formule recommandée dans les Pharmacopées européenne et américaine pour le contrôle des contaminations microbiennes :

Tableau 1 : Composition du milieu gélosé MacConkey (**Pharmacopée Européenne 8.0**).

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

1.3.2. Milieu liquide aux peptones de caséine de soja (TSB)

Le Tryptic Soy Broth (Soybean-Casein Digest Medium, bouillon de soja tryptique, milieu digéré de soja-caséine) constitue un milieu nutritif universel convenant pour un large éventail d'emplois. Étant donné son excellente valeur nutritive, il favorise la culture d'une grande variété de microorganismes.

Dans ce milieu, les produits de la digestion enzymatique de caséine et de semoule de soja fournissent des aminoacides et d'autres composés azotés complexes nécessaires à la croissance. Le glucose (dextrose) constitue une source d'énergie. Le chlorure de sodium assure l'équilibre osmotique. Le phosphate de potassium dibasique agit comme un tampon et permet de contrôler le pH [6].

En raison de sa capacité de promotion de croissance, cette formulation a été adoptée par la pharmacopée américaine (USP) (**Annexe 1**) et par la pharmacopée européenne (EP) (**Annexe 1**) en tant que milieu adapté au test de stérilité :

Tableau 2 : Composition du bouillon de soja tryptique (**Pharmacopée Européenne 8.0**).

Peptone pancréatique de caséine	17,0 g
Peptone papainique de soja	3,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate dipotassique	2,5 g
Glucose monohydraté	2,5 g
Eau purifiée	1000

1.3.3. Milieu Sabouraud dextrosé – gélosé (SAB)

La Sabouraud Dextrose Agar est un milieu classique non sélectif servant à la culture et la conservation des champignons pathogènes et non pathogènes. La sélectivité est obtenue par l'ajout du chloramphénicol. Il est recommandé dans les contrôles de stérilité des produits pharmaceutiques, cosmétiques ou alimentaires.

Dans la Sabouraud Glucose Agar, la néopeptone constitue une source de facteurs de croissance azotés. Le glucose (dextrose) fournit une source de carbone et d'énergie pour la croissance des microorganismes. La forte concentration en glucose et le pH relativement faible favorisent la croissance des champignons, mais de nombreuses bactéries ne tolèrent pas la forte concentration de sucre et sont partiellement inhibées par le faible pH. Cependant, sans enrichissement en antimicrobiens antibactériens, le milieu se caractérise par une faible sélectivité [6]. La formule-type répond notamment à la composition décrite dans la Pharmacopée européenne :

Tableau 3 : Composition du milieu gélosé Sabouraud (**Pharmacopée Européenne 8.0**).

Dextrose	40,0 g
Mélange de Peptone peptique de tissu animal et de peptone de caséine (1 :1)	10,0 g
Gélose	15,0 g
Eau purifiée	1000 mL

1.3.4. Milieu gélosé à la bile-violet-rouge avec glucose (VRBG)

Le milieu de culture VRBG est un milieu sélectif destiné à déterminer la présence et estimer la quantité d'Enterobacteriaceae présentes dans divers produits, notamment dans des produits pharmaceutiques.

Les sels biliaires ainsi que le cristal violet inhibent la croissance des bactéries à Gram positif. L'utilisation du glucose entraîne une acidification du milieu, faisant virer l'indicateur coloré (rouge neutre) pour donner des colonies roses à rouges avec ou sans précipité rouge [6].

Sa composition dans le tableau suivants est décrite par la Pharmacopée européenne :

Tableau 4 : Composition de la gélose à la bile-violet-rouge avec glucose (**Pharmacopée Européenne 8.0**).

Extrait de Levure	3,0 g
Hydrolysate pancréatique de la gélatine	7,0 g
Sels biliaires	1,5 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Glucose monohydraté	10,0 g
Gélose	15,0 g
Rouge neutre	30 mg
Violet cristallisé	2 mg
Eau purifiée	1000

1.3.5. Milieu gélosé mannitol sel (Chapman)

La gélose mannitol-sel est utilisée pour l'isolement sélectif des staphylocoques et la détection des *Staphylococcus aureus* à partir d'échantillons cliniques.

Ce milieu est une préparation élaborée par Chapman pour différencier les staphylocoques coagulase positifs (p. ex. *Staphylococcus aureus*) des staphylocoques coagulase négatifs. Elle est utilisée pour isoler les staphylocoques provenant d'échantillons cliniques, de cosmétiques et pour les tests de dénombrement des microorganismes [6].

Sa formule est recommandée dans les Pharmacopées européenne pour le contrôle des contaminations microbiennes :

Tableau 5 : Composition du milieu gélosé mannitol sel (**Pharmacopée Européenne 8.0**).

Peptone pancréatique de caséine	5,0 g
Peptone peptique de tissu animal	5,0 g
Extrait de viande de bœuf	1,0 g
D-Mannitol	10,0 g
Chlorure de sodium	75,0 g
Gélose	15,0 g
Rouge de phénol	0,025 g
Eau purifiée	1000

1.3.6. Milieu gélosé au cétrimide

La Pseudosel Agar (gélose Pseudosel) (gélose cétrimide) est utilisée pour l'isolement sélectif de *Pseudomonas*. Ce milieu est basé sur la formule de la Tech Agar, visant à stimuler la production de pyocyanine de *Pseudomonas aeruginosa*. Toutefois, elle est modifiée par l'ajout de cétrimide, qui permet l'inhibition sélective de microorganismes autres que *P. aeruginosa*.

La gélose cétrimide est utilisé pour l'isolement de *P.aeruginosa*, tant dans les zones pharmaceutiques que cliniques, et les pharmacopées américaine et européenne mentionnent son utilisation dans les tests de dénombrement de microorganismes [6]. Sa formule est la suivante :

Tableau 6 : Composition du milieu gélosé cétrimide (**Pharmacopée Européenne 8.0**).

Hydrolysats pancréatique de gélatine	20,0 g
Chlorure de magnésium	1,4 g
Sulfate dipotassique	10,0 g
Cétrimide	0,3 g
Gélose	13,6 g
Eau purifiée	1000 mL
Glycérol	10,0 mL

3. Protocole de la validation microbiologique des milieux de culture dans l'industrie pharmaceutique

3.1. Préparation des milieux de culture

La qualité du produit final dépend souvent de la technique utilisée pour remettre les milieux en solution, pour cela il faut suivre les principales étapes décrites ci-dessous :

- **Etape n°1 : Pesée**

On commence par peser la quantité de poudre voulue qui est mentionnée dans le tableau ; un ou plusieurs constituants dans le cas de milieu composé de plusieurs ingrédients, au moyen d'une balance analytique calibrée.

La précision n'influence pas trop sur la préparation des milieux de culture sauf pour la pesée de certains corps chimique pour lesquels il existe une précision de l'ordre de 0.0001g.

Tableau 7 : Masse des milieux déshydratés en gramme nécessaire pour la dilution dan 1L d'eau purifiée.

Les Milieux	g/L
MCA	51,5
TSB	30
SAB	65
VRBG	41,5
Chapman	111
CET	45,3

- **Etape n°2 : Dissolution**

Les substances à ajouter seront fait dans l'ordre indiqué de la formule de préparation des milieux de culture dans le cas où le milieu est constitué de plusieurs ingrédients.



Figure 5 : Dissolution du milieu déshydraté.

- **Etape n°3 : Ajustement du pH**

C'est la phase la plus sensible de toute la préparation en étant indispensable, car le pH de l'eau purifiée peut varier selon les conditions d'obtention et de stockage.

La vérification du pH et l'ajustement si nécessaire à la valeur indiquée sur la fiche technique en respectant l'intervalle, correspond à la concentration en ions hydrogène du milieu qu'il faut respecter afin de préserver la vie des bactéries à étudier.

La mesure du pH, doit donc être effectuée le plus correctement possible, comme l'indique le tableau ci-après, de préférence avant et après stérilisation en utilisant un pH mètre à affichage numérique. Toute correction éventuelle se fait à environ 45°C.

Tableau 8 : pH approprié pour chaque milieu de culture étudié.

Les Milieux de Culture	pH	Intervalle d'Erreur	Température
MCA	7,1	± 0,2	45°C
TSB	7,3	±0,2	45°C
SAB	5,6	±0,2	45°C
VRBG	7,4	±0,2	45°C
Chapman	7,4	±0,2	45°C
CET	7,2	±0,2	45°C

- **Etape n°4 : Stérilisation**

Sauf indication contraire, la stérilisation est effectuée le plus souvent à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

- **Etape n°5 : Réajustement du pH après stérilisation**

Même opération citée dans l'étape n° 3 cependant les solutions d'ajustement d'NAOH et HCL doivent être stérile et l'opération se déroule dans des conditions d'asepsie totale devant un Bec bunsen

- **Etape n°6 : Répartition des milieux de culture**

Les milieux de culture sont le plus souvent répartis soit dans des tubes, soit dans des flacons sirops selon le besoin et ce après stérilisation, le mieux serait de remplir les flacons au $\frac{3}{4}$ en veillant à ce que le milieu n'arrive pas à plus de 3 cm du bouchon dans le cas des milieux gélosés.

Une fois repartis les flacons sont étiquetés les étiquettes doivent contenir ; nom du milieu, code utilisé, date de péremption et de limite de conservation si nécessaire et les conserver dans un endroit frais à l'abri de poussières au frigo a une température entre 2 à 8 C°.



Figure 6 : Répartition des milieux de culture dans des flacons étiquetés, 1 : milieux liquides ;
2 : milieu gélosé.

Après l'étape de stérilisation le milieu doit être manipulé dans des conditions aseptiques afin de le protéger contre les contaminations extérieures.

3.2. Calibrage des souches microbiennes

3.2.1. Souches de contrôle de référence

Les souches de contrôle de référence sont un élément essentiel à tout programme de contrôle de la qualité en microbiologie et leur utilisation doit être documentée (**OPTMQ, 2017**).

3.2.2. Choix des souches de contrôle

Les souches de contrôle doivent avoir des caractéristiques représentatives de leur espèce, être pures et être stables.

Le nombre de repiquage des souches de contrôle primaires devrait être documenté et, de façon générale, limité à trois. Éviter les repiquages multiples en série.

Outre les souches de référence de l'ATCC (American Type Culture Collection), les souches de contrôle connues et acceptées peuvent avoir une des provenances suivantes (**OPTMQ, 2017**) :

- Contrôle externe de la qualité ;
- Origine clinique, confirmée par un laboratoire de référence ;
- Disques commerciaux ; ou
- Organismes identifiés et de phénotypes stables isolés de patients.

3.2.3. Conservation des souches de contrôle

La méthode et la durée de conservation des souches de contrôle doivent viser le maintien des caractéristiques de l'espèce et minimiser les possibilités de contamination.

La congélation des souches de contrôle en cryotubes à -20°C (au frigo) demeure la méthode la plus utilisée pour la conservation à long terme. Elles peuvent se conserver jusqu'à 5 ans à cette température (**OPTMQ, 2017**).

Et pour les souches ensemencées sur boîtes de Pétri, tube à essai doivent être conservées au frigo à 2-8°C pendant 2 mois.

3.2.4. Protocole de calibrage des souches microbiennes

Le protocole est réalisé dans des condition d'asepsie totale sous une hotte à flux laminaire en portant des gants, une charlotte et une bavette.

a) Repiquage des souches

1- A partir des cryotubes

La technique de conservation des souches microbiennes à basse température (-20°C) dans des cryotubes permet de les conserver sur une durée moyenne de 5 ans.



Figure 7 : Souche pure d'*Escherichia coli* mise dans un cryotube.

Le repiquage se fait en surface à l'aide des écouvillons avec deux répétitions pour chaque souche. On utilise le milieu Sabouraud pour les champignons et la gélose typtone soja pour les bactéries. Comme le tableau ci-après l'indique, l'incubation est réalisée dans une durée et température spéciales pour chaque souche.

Tableau 9 : Temps et température nécessaires pour l'incubation des souches microbiennes.

Souche Microbienne	Milieu de Culture	Temps	Température
<i>Candida albicans</i>	SAB	48-72h	22,5°C
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	SAB	48-72h	22,5°C
<i>Escherichia coli</i>	TSA	48h	43C
<i>Bacillus pumilus</i>	TSA	48h	32,5°C
<i>Pseudomonas aeroginosa</i>	TSA	48h	32,5°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	TSA	48h	32,5°C
Témoin	SAB	48-72h	22,5°C
Témoin	TSA	48h	32,5°C

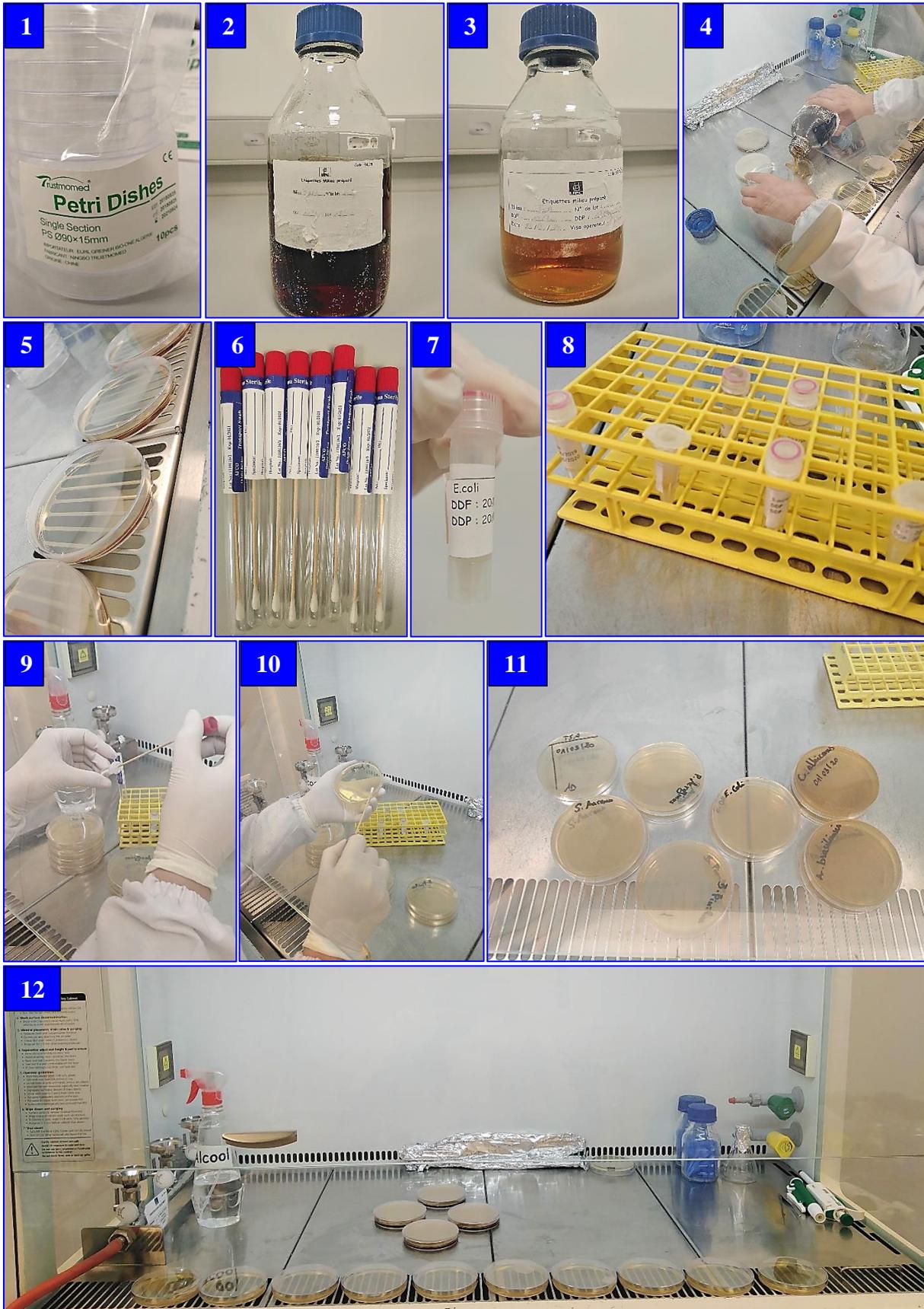
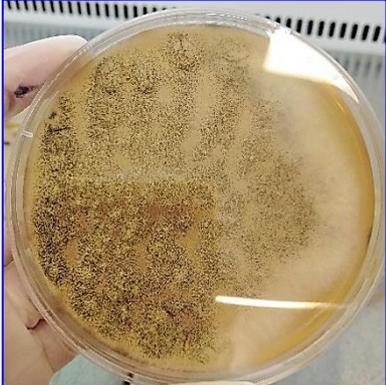
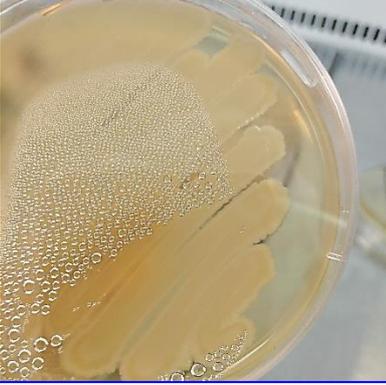
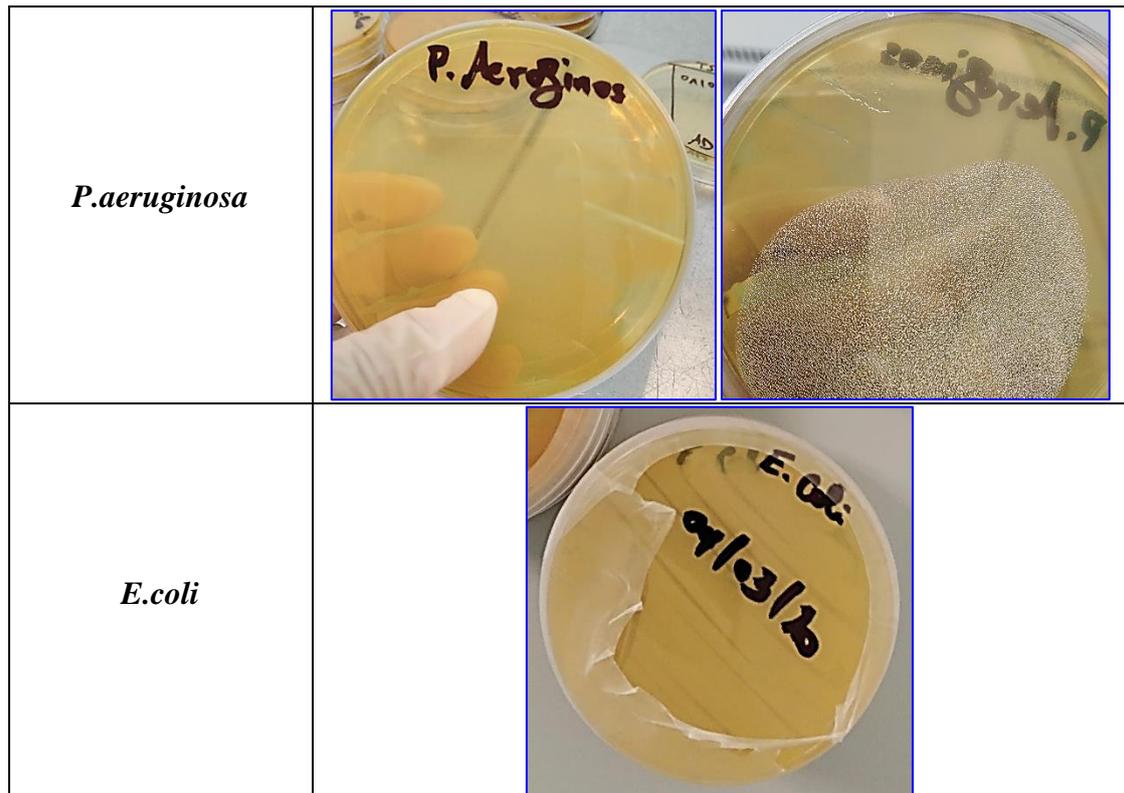


Figure 8 : Etapes de repiquage des souches.

Tableau 10 : Aspect des souches microbiennes après Incubation dans les milieux TSA et SAB.

<i>A. brasiliensis</i>		
<i>C. albicans</i>		
<i>S. aureus</i>		
<i>B. pumilus</i>		



2- A partir des boites de pétri

Le repiquage se fait à partir des boites de pétri conservées à température entre 4 et 6°C avec une durée de conservation de 2 mois.

- **Enrichissement sur TSB**

Quelques colonies sont prélevées à l'aide d'une anse de platine, et les introduire dans 9ml de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja (TSB).

Les tubes sont incubés pendant 24h pour les souches bactériennes et 48-72h pour les souches fongiques.

- **Repiquage**

Il est effectué sur TSA et SAB dans des conditions d'incubation indiquées en tableau n°9.

b) Préparation des dilutions

Des dilutions décimales sont préparées à partir des boites déjà incubées dans des solutions tampon peptonée au chlorure de sodium.

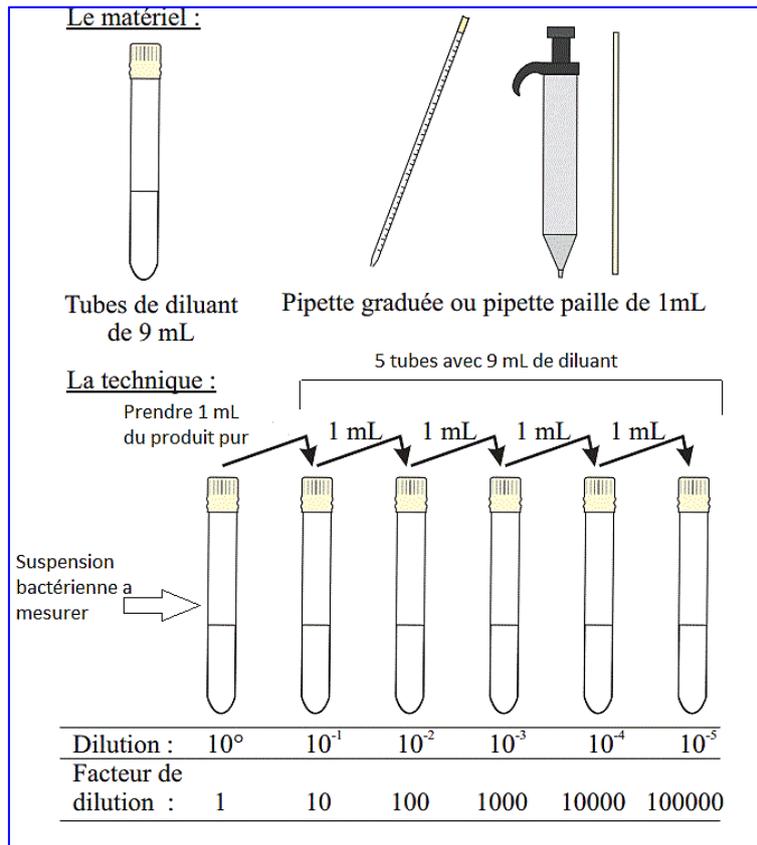
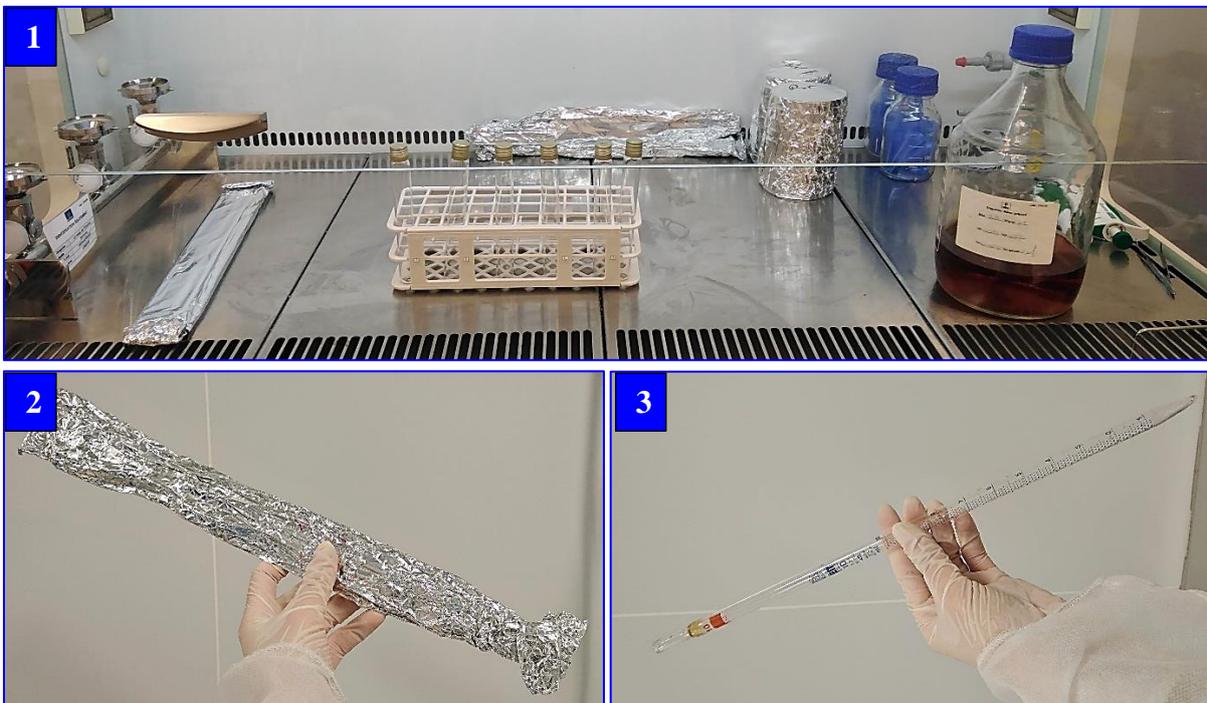


Figure 9 : Technique des dilutions décimales [7].



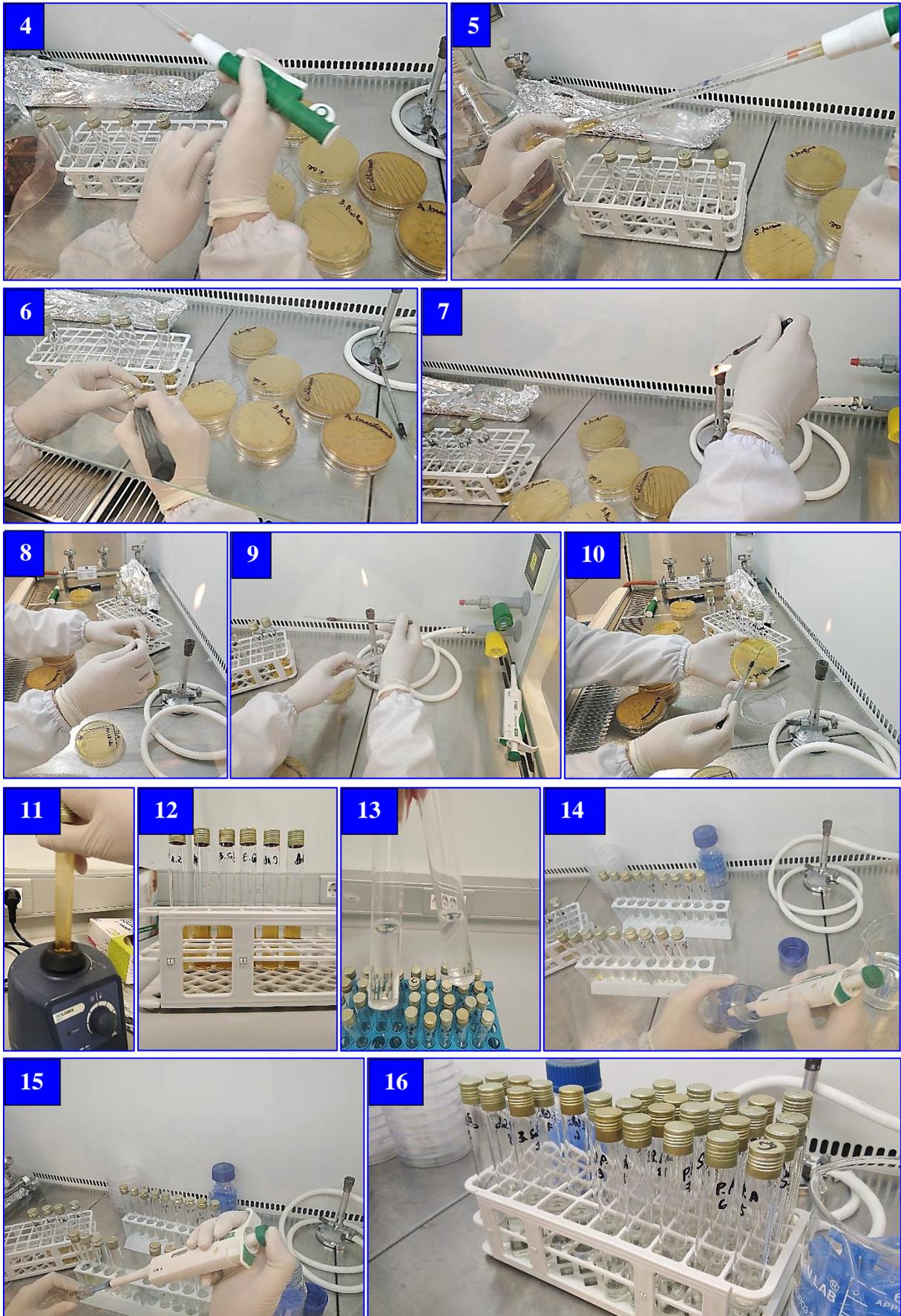


Figure 10 : Etapes de préparation des dilutions.

Un ensemencement en profondeur des boîtes de GN est réalisé à partir des dilutions de 10^{-4} à 10^{-6} ou bien 10^{-4} à 10^{-9} (2boîtes pour chaque dilution) dans des conditions spécifiques pour chaque souche (tableau 10), sans oublier une boîte témoin de stérilité.

Tableau 10 : Conditions d'incubation spécifiques pour chaque souche.

Souche Microbienne	Temps	Température
<i>Candida albicans</i>	72h	22,5°C
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	72h	22,5°C
<i>Escherichia coli</i>	24h	43°C
<i>Bacillus pumilus</i>	24h	32,5°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24h	32,5°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	24h	32,5°C
Témoin	48-72h	22,5°C

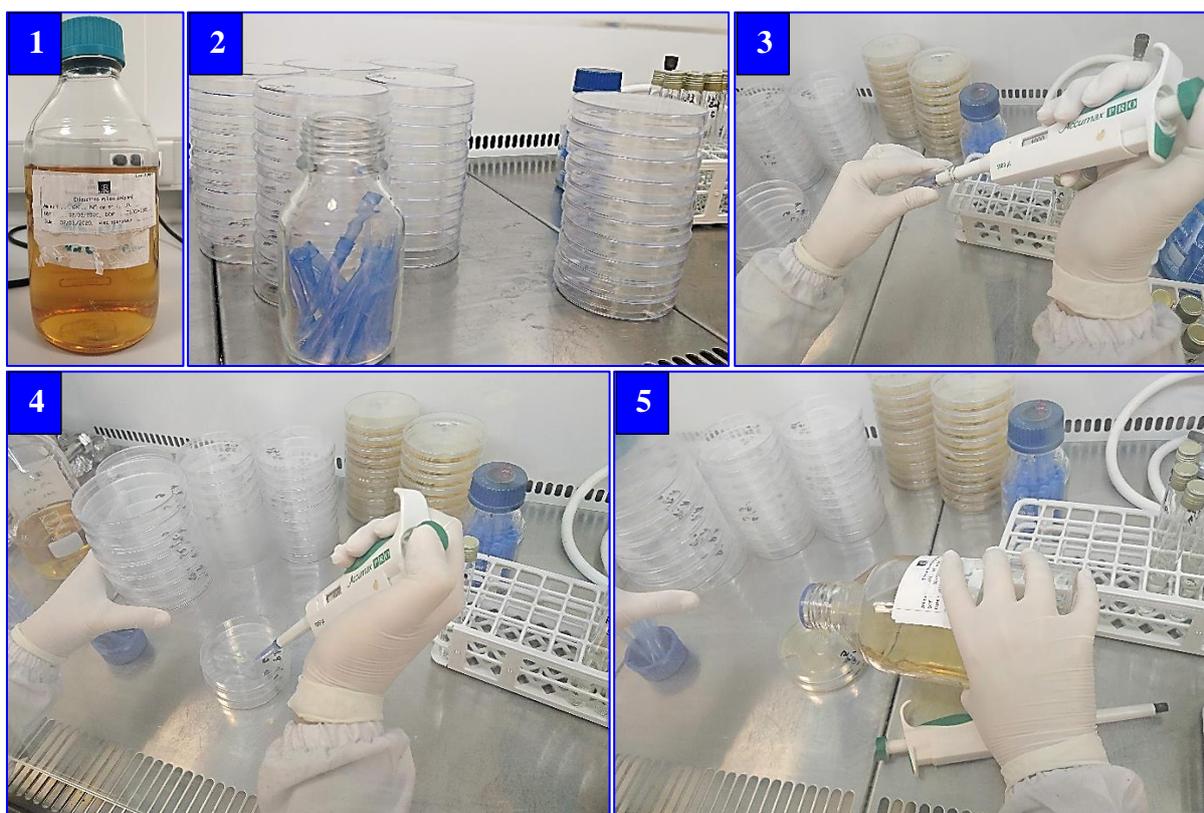


Figure 11 : Etapes d'ensemencement en profondeur en gélose nutritive.

3.3. Validation des milieux de culture :

Après incubation l'ensemencement des souches se fait à partir de la dilution qui correspond au maximum à 100 UFC les milieux liquide et gélosé (ensemencement en surface sur milieu gélosé avec 0,1ml en stries et 1 ml sur milieu liquide) dans des conditions spécifiques (temps et température) pour chaque microorganisme comme le tableau n°11 le montre. Deux ensemencements et des témoins de stérilité sont réalisés pour chaque échantillon.

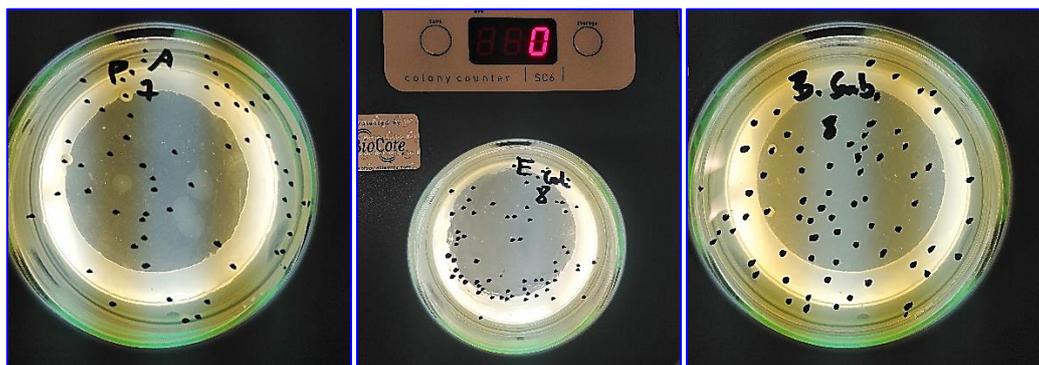


Figure 12 : Comptage de colonies sur la gélose nutritive.

Tableau 11 : conditions d'incubation des souches de référence ensemencées sur les milieux validés.

Milieux de culture	Souches ensemencées	Température d'incubation(°C)	Durée d'incubation
MCA	<i>E.coli</i>	32,5	72h
TSB	<i>S.aureus</i>	32,5	24h
	<i>P.aeruginosa</i>	32,5	24h
	<i>B.pumilus</i>	32,5	24h
SAB	<i>C.albicans</i>	22,5	5-7jrs
	<i>A.brasiliensis</i>	22,5	5-7jrs
VRBG	<i>P.aeruginosa</i>	32,5	24h
	<i>E.coli</i>	32,5	24h
Chapman	<i>E.coli</i>	32,5	24h
	<i>S.aureus</i>	32,5	72h
Cétrimide	<i>P.aeruginosa</i>	32,5	72h
	<i>E.coli</i>	32,5	72h

L'épreuve de stérilité s'effectue en conditions aseptiques sous une hotte à flux laminaire afin d'éviter toute contamination accidentelle durant l'essai ce qui donnerait des lectures faussement positives.

Les précautions prises pour éviter la contamination doivent être telles qu'elles ne doivent pas avoir d'effet sur d'éventuels microorganismes contaminants qui devraient être révélés lors du test pendant l'essai. Il faut surveiller régulièrement les conditions de travail par échantillonnage de l'air et des surfaces du poste de travail [8].

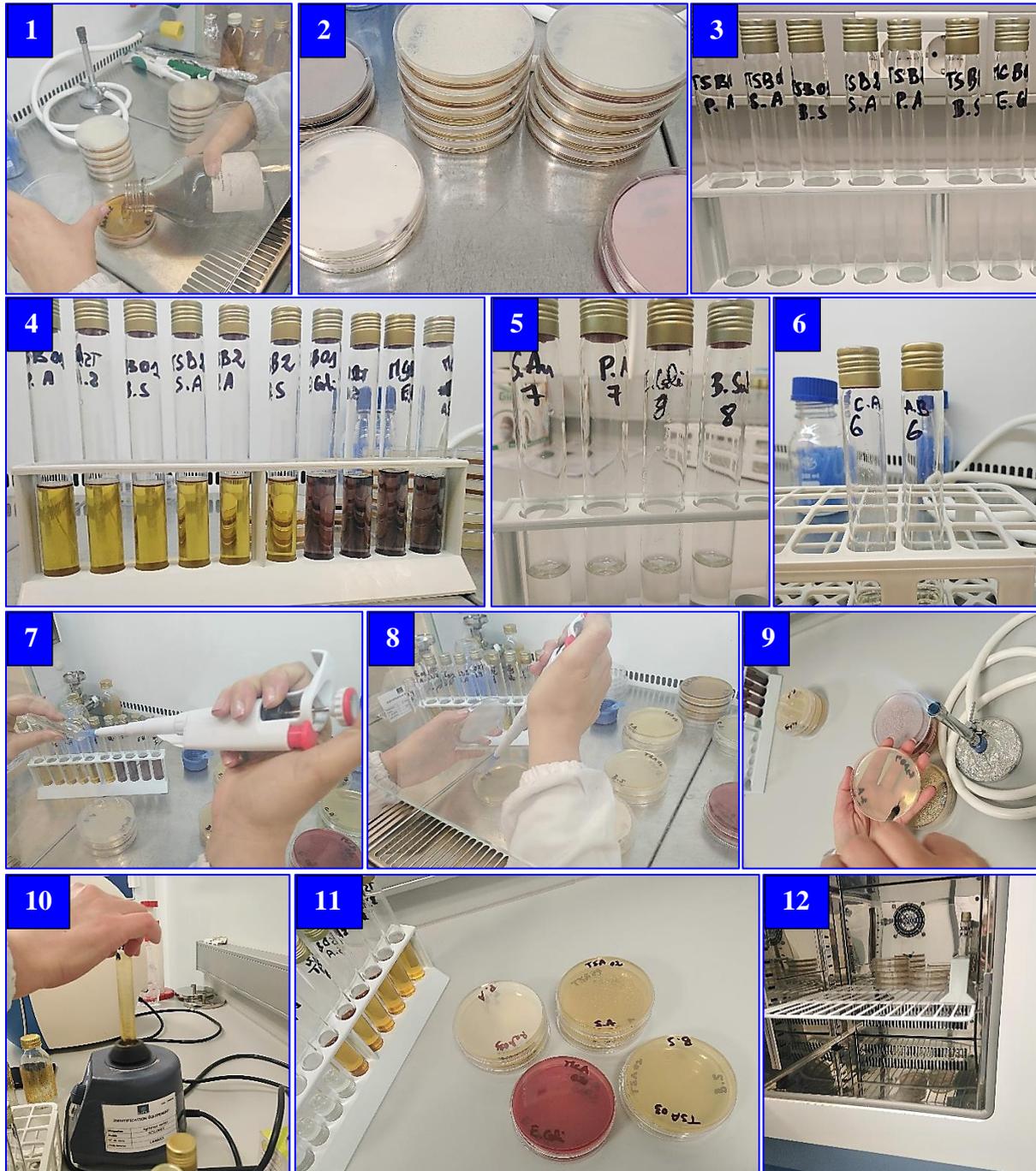


Figure 13 : Etapes de validation des milieux.

Incuber à une température spécifiée :

- Pendant une durée inférieure ou égale à la durée minimale spécifiée pour l'essai (contrôle de fertilité),
- Pendant une durée égale ou supérieure à la durée maximum (contrôle des propriétés inhibitrices)
- Pendant une durée comprise dans l'intervalle spécifiée pour l'essai (contrôle des propriétés indicatives).



*Chapitre 3 :
Résultats et discussion*

La validation des milieux de culture permet le dénombrement des bactéries mésophiles et des moisissures et levures capables de croître en aérobiose.

Elle est en premier lieu destinée à déterminer si une substance ou préparation satisfait à une spécification préétablie en matière de qualité microbiologique.

Il convient dans ce cas de se conformer aux indications données, notamment en ce qui concerne le nombre d'échantillons à prélever et l'interprétation des résultats (**Pharmacopée Européenne 8.0**).

1. Test de stérilité

Si aucune croissance de microorganismes n'est observée dans aucune des boîtes de Pétri et bouillons pendant la période d'incubation et à la fin de celle-ci, la préparation examinée est considérée comme stérile. La multiplication de microorganismes se traduit par une turbidité du bouillon et plusieurs colonies sur boîte de Pétri [8].

Le test est valable et confirmé dans les témoins (milieux non ensemencés), par

- Absence de croissance des germes
- Clarté du bouillon

D'après ce résultat, on conclut que les milieux validés sont stériles.

2. Test de fertilité

2.1. Calibrage des souches

La lecture se fait grâce au compteur de colonies afin de choisir les boîtes qui ont la bonne concentration en UFC, et comme on a ensemencé 0.1ml de chaque souche on doit choisir la dilution qui nous a donné ≤ 100 colonies.

Tableau 12 : Choix de l'unité formant colonie de chaque souche.

Souche microbienne	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	<i>Candida albicans</i>
Dilution	10^{-7}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}
UFC ≤ 100	96	95	92	93	90	91

2.2. Vérification des performances

La fertilité des milieux est confirmée par la bonne croissance des germes et l'inhibition des autres indésirables en cas des milieux sélectifs, qui sont indiquées dans le tableau ci-après (tableau n°13).

Tableau 13 : Propriétés des milieux de culture validé (Pharmacopée Européenne 8.0).

	Milieu	Propriétés	Microorganisme de référence
Recherche des germes aérobies	Bouillon de soja tryptique	Fertilité	<i>S.aureus</i>
			<i>P.aeruginosa</i>
			<i>B.pumilus</i>
Recherche des bactéries Gram négatif résistant au sel biliaires	Milieu gélosé à la bile-violet-rouge avec glucose	Fertilité+indication	<i>E.coli</i>
			<i>P.aeruginosa</i>
Recherche d'Escherichia coli	Milieu gélosé de MacConkey	Fertilité+indication	<i>E.coli</i>
Recherche de Pseudomonas aeruginosa	Milieu gélosé cétrimide	Fertilité	<i>P.aeruginosa</i>
		Inhibition	<i>E.coli</i>
Recherche Staphylococcus aureus	Milieu gélosé mannitol- sel	Fertilité+indication	<i>S.aureus</i>
		Inhibition	<i>E.coli</i>
Recherche des levures et moisissures	Milieu sabouraud déxtrosé gélosé	Fertilité+indication	<i>C.albicans</i>
			<i>A.brasiliensis</i>

Le nombre de colonies cultivées doit être équivalent à la quantité inoculée (100 germes).

La croissance ne doit pas différer de plus d'un facteur de 2 de la valeur initiale (tableau 14).

Tableau 14 : Interprétation du facteur de deux.

Nombre d'UFC dénombrés	Interprétation
< 50	Milieu peu ou pas fertile et ne peut être utilisé pour les essais.
50 à 200	Milieu adéquat pour les essais.

2.2.1. Milieu gélosé MacConkey (MCA)

Le résultat de l'ensemencement sur milieu MCA a donné les résultats suivants (tableau 15)

Tableau 15 : Résultat du test de fertilité du milieu MacConkey.

Souches	Croissance	UFC	Observation	Explications
<i>E.coli</i>	+	115	-Virage de couleur en rouge rosâtre. -Des colonies rosâtres entourées d'un halo opaque de la même couleur.	-la fermentation du lactose est révélée par la couleur rouge due à la production de l'acide (pH<6,8) : la bactérie est lactose (+).

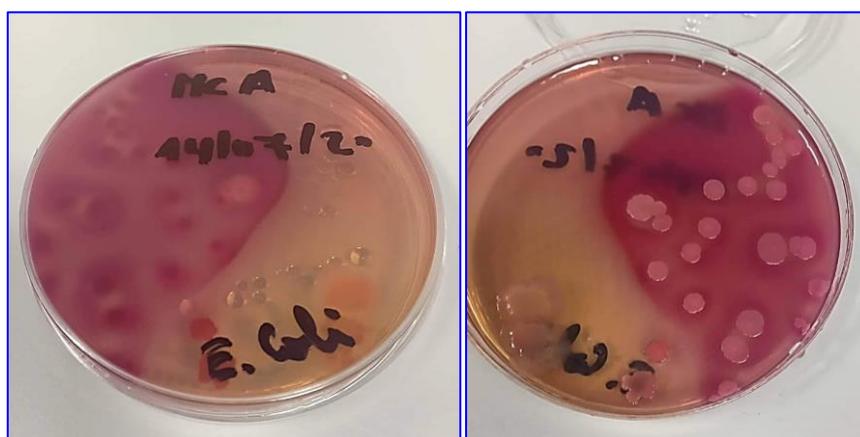


Figure 14 : Croissance d'*E.coli* sur la gélose MacConkey.

La gélose MacConkey est utilisée pour l'isolement des bactéries entériques à Gram négatif et pour la différenciation entre elles à partir de leur capacité à fermenter le lactose

D'après les résultats, on constate que les réactions chimiques se sont bien déroulées avec une très bonne croissance microbienne ($50 < \text{UFC} = 115 < 200$).

La gélose MacConkey est utilisée pour l'isolement des bactéries entériques à Gram négatif et pour la différenciation entre elles à partir de leur capacité à fermenter le lactose.

Il est utilisé pour l'isolement des coliformes et des agents pathogènes intestinaux dans l'eau, les produits laitiers et les échantillons biologiques.

Les souches (*E.coli*) qui fermentent le lactose et produisent ainsi un environnement acide deviennent rouges ou roses et peuvent être entourées d'une zone de bile précipitée par un acide.

La couleur rouge est due à la production d'acide à partir du lactose, à l'absorption du rouge neutre et à un changement de couleur ultérieur du colorant lorsque le pH du milieu tombe en dessous de 6,8. Les sels biliaires peuvent également précipiter hors des milieux entourant la croissance des fermenteurs en raison du changement de pH.

Les non fermenteurs produiront des colonies incolores et transparentes et ne modifient généralement pas l'aspect du milieu.

Le cristal violet et les sels biliaires sont des agents sélectifs, qui inhibent la plupart des espèces de bactéries à Gram positif [9].

La gélose MacConkey est un milieu fertile

2.2.2. Milieu liquide aux peptones de caséine de soja (TSB)

Le TSB est un milieu d'enrichissement liquide polyvalent hautement nutritif utilisé dans des procédures qualitatives pour le test de stérilité et pour l'enrichissement et la culture de microorganismes aérobies modérément exigeants [6]. L'incubation de *S.aureus*, de *P.aeruginosa* et de *B.pumilus* sur TSB a donné les résultats ci-dessous.

Tableau 16 : Résultat du test de fertilité du bouillon de soja tryptique.

Souches	Croissance	Observation	Explication
<i>S.aureus</i>	+	-Trouble et opacité bien observés.	-la pousse abondante des germes.
<i>P.aeruginosa</i>			
<i>B.pumilus</i>			



Figure 15 : Comparaison entre un bouillon de soja tryptique témoin :1 et un autre ensemencé :2.

L'association entre la Tryptone et la peptone papainique de soja réalise une synergie entre l'apport protidique de la caséine et l'apport glucidique du soja, permettant ainsi d'obtenir une croissance optimale pour un nombre élevé de germes. Le glucose constitue la source énergétique. Le chlorure de sodium maintient l'équilibre osmotique. Le phosphate dipotassique agit comme substance tampon pour le maintien du pH [10].

Dans les milieux à base de bouillon, la croissance est mise en évidence par la présence de turbidité, de grains ou de floculation, tandis qu'un milieu de contrôle non ensemencé demeure transparent et exempt de turbidité après l'incubation s'il est stérile.

Le milieu liquide de soja tryptique est un milieu fertile.

2.2.3. Milieu Sabouraud dextrosé – gélosé (SAB)

Le milieu Sabouraud Dextrose gélosé est un milieu non sélectif servant à la culture des champignons (levures et moisissures).

La culture sur ce milieu a donné les résultats mentionnés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 17 : Résultats du test de fertilité de la gélose Sabouraud.

Souches	Croissance	UFC	Observations
<i>C.albicans</i>	+	86	-Des colonies de couleur blanche à crème.
<i>A.brasiliensis</i>	+	97	-Des colonies poudreuses à granuleuses, duveteuses, de teinte noirâtre. Le revers est incolore à jaune.

La croissance des deux microorganismes est comprise entre 50 et 200 UFC.

Lorsqu'un délai d'incubation suffisant est atteint, les récipients doivent présenter des colonies isolées dans les zones striées et une croissance confluyente dans les zones d'inoculation importante ce qui est le cas pour notre milieu.

On conclut que le milieu Sabouraud est un milieu fertile.

2.2.4. Milieu gélosé à la bile-violet-rouge avec glucose (VRBG)

La VRBG est destiné à la détection et au dénombrement des entérobactéries dans les produits pharmaceutiques et les aliments.

Après incubation de *P.aeruginosa* et *E.coli* à 32,5°C, on a eu les résultats suivants :

Tableau 18 : Résultats de test de fertilité du milieu gélosé à la bile-violet-rouge avec glucose.

Souches	Croissance	UFC	Observations	Explications
<i>P.aeruginosa</i>	+	83	-colonies roses entourées d'un halo	-fermentation du glucose entraîne une acidification du milieu (pH<6,8). - L'halo est dû à la précipitation des sels biliaires à cause du changement du pH.
<i>E.coli</i>	+	99		

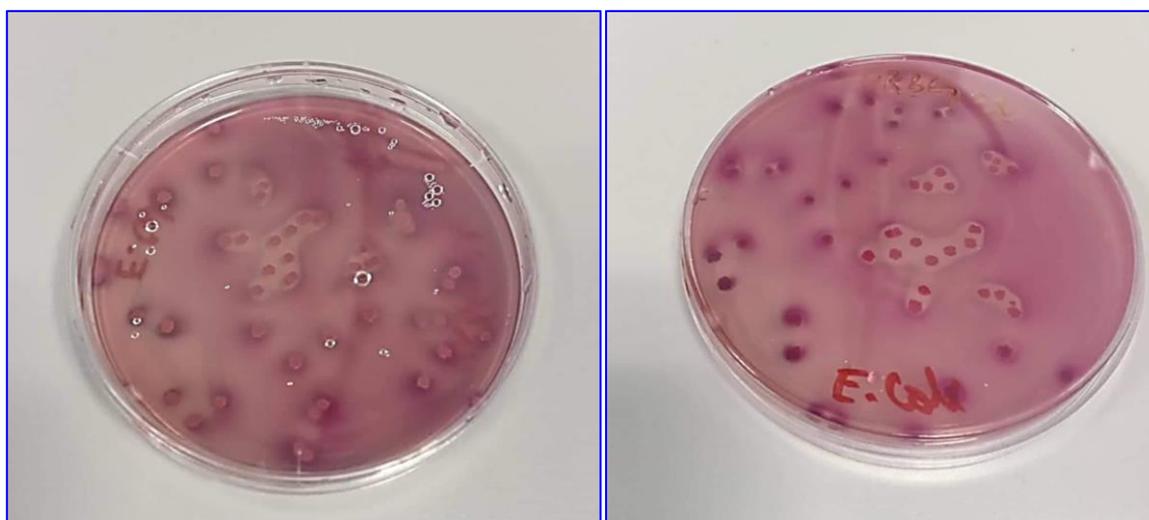


Figure 16 : Croissance d'*E.coli* sur la VRBG.

Le tableau montre que les réactions se sont bien déroulées avec une croissance microbienne comprise entre 50 et 200.

Les entérobactéries fermentent rapidement le glucose et réduisent ainsi le pH du milieu, ce qui produit des colonies de couleur violet / rose en raison de l'inclusion de l'indicateur rouge neutre et du cristal violet dans le milieu. Ces colonies sont généralement entourées de halos violets de sels biliaires précipités. Le cristal violet ainsi que les sels biliaires inhibent la croissance de la flore Gram-positive.

Ces observations montrent que la gélose VRBG est un milieu fertile.

2.2.5. Milieu gélosé mannitol sel (Chapman)

La gélose Chapman est un milieu de culture semi-synthétique, sélectif et différentiel utilisé pour la sélection des bactéries halophiles, et plus particulièrement de celles qui fermentent le mannitol comme les staphylocoques [11].

Les résultats du test de fertilité sur milieu Chapman sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau 19 : Résultats du test de fertilité du milieu mannitol sel.

Souches	Croissance	UFC	Observations	Explications
<i>S.aureus</i>	+	123	- Colonies de taille moyenne et de couleur jaune. -virage du milieu à la couleur jaune.	-bactérie coagulase (+) -fermentation du mannitol (mannitol +) révélé grâce au virage de l'indicateur coloré de pH : le rouge de phénol
<i>E.coli</i>	-	0	- Croissance nulle	-inhibition complète des colonies par le chlorure de sodium (concentration trop élevée du sel).

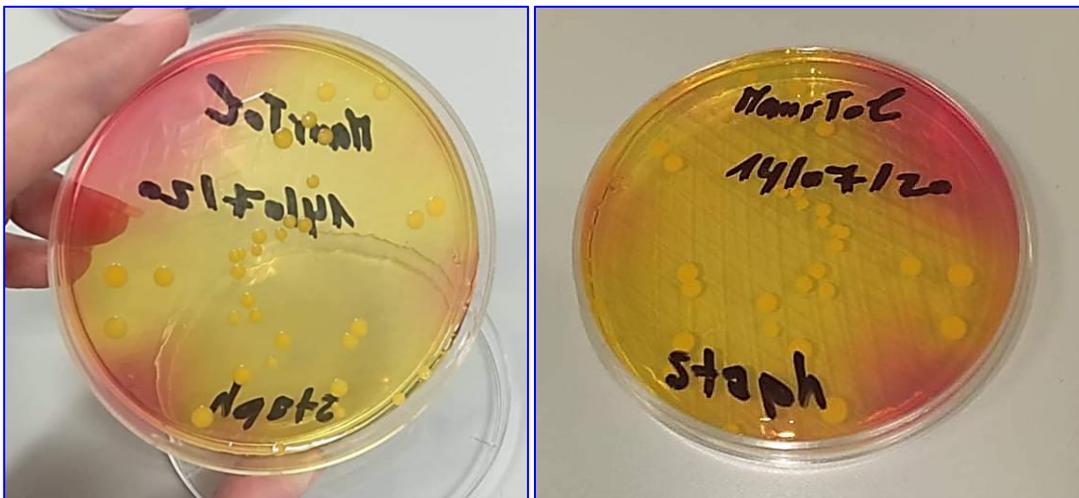


Figure 17 : Croissance de la bactérie *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman.

D'après ces résultats, on constate qu'il y a eu une bonne croissance de *S.aureus* avec une inhibition totale d'*E.coli*.

La concentration à 7,5 % du chlorure de sodium entraîne l'inhibition partielle ou complète des organismes bactériens autres que les staphylocoques. La fermentation du mannitol, signalée par un changement de l'indicateur au rouge de phénol, permet de différencier les espèces de staphylocoques. Les staphylocoques coagulase positifs (p. ex. *Staphylococcus aureus*) produisent des colonies de couleur jaune et une coloration jaune du milieu environnant, tandis que les staphylocoques coagulase négatifs produisent des colonies de couleur rouge et aucun changement de teinte de l'indicateur au rouge de phénol [6].

Dans ce cas, le micro-organisme cultivant sur ce milieu a mis en évidence son caractère halophile.

Le milieu Chapman est fertile.

2.2.6. Milieu gélosé au cétrimide

La gélose au cétrimide est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement et l'identification présomptive de *Pseudomonas aeruginosa*.

Après l'incubation, les boîtes de Pétri sont observées afin d'évaluer la croissance et de détecter

L'apparition d'une pigmentation typique allant du bleu-vert au vert en périphérie. La fluorescence peut être détectée sous une lampe UV (254 nm). La présence de pyocyanine peut être confirmée par extraction au chloroforme. Les *P.aeruginosa* produisent généralement de la pyocyanine et de la fluorescéine. La morphologie de la colonie et la formation de pigments peuvent varier d'une souche à l'autre. Les résultats de ce test sont récapitulés dans le tableau suivant.

Tableau 19 : Résultats du test de fertilité du milieu cétrimide.

Souches	Croissance	UFC	Observations	Explications
<i>P.aeruginosa</i>	+	123	- Croissance pigmentée de bleu-vert autour des colonies. - fluorescence sous lumière UV	- production de la pyocyanine. - production de la fluorescéine (ou la pyoverdine)
<i>E.coli</i>	-	0	-milieu clair, pas de croissance	-inhibition des colonies

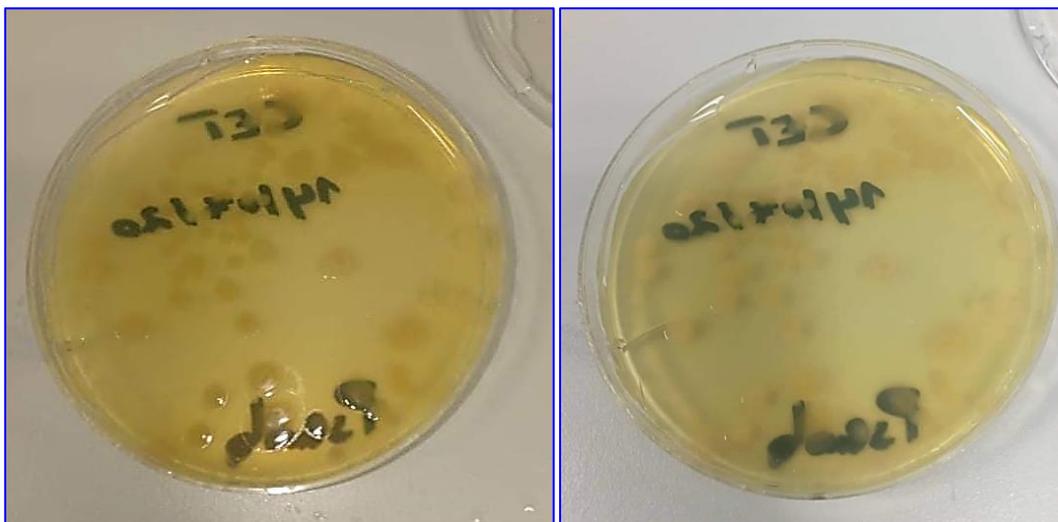


Figure 18 : Croissance de *Pseudomonas aeruginosa* sur la gélose cétrimide.

Dans la Pseudosel Agar, la peptone constitue une source d'azote et le glycérol est utilisé comme source de carbone et d'énergie. La production de pyocyanine dans le milieu est stimulée par le chlorure de magnésium et le sulfate de potassium. La cétrimide (bromure de cetyltriméthylamonium) est un composé qui inhibe le développement d'un grand nombre de microorganismes, notamment de certains autres *Pseudomonas sp.* Et microorganismes apparentés.

D'après ces résultats, on conclut que la gélose cétrimide est fertile.



Conclusion

Le contrôle qualité des produits pharmaceutiques réalisé en Algérie dans les laboratoires pharmaceutiques. LNCPP « laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques » (**Annexe 1**) exige la validation des milieux de culture utilisés dans les analyses microbiologiques pour s'assurer de la bonne qualité du produit destiné à la commercialisation sur le marché et éviter toute sorte de contamination par les microorganismes.

La validation des milieux de culture est aujourd'hui considérée comme une démarche essentielle qui apporte à l'opérateur la confiance nécessaire dans les résultats obtenus lors de sa mise en œuvre.

Dans ce contexte, nous avons effectué un stage d'un mois au sein du laboratoire UPC (Union pharmaceutique constantinoise). De ce fait, nous nous sommes intéressés à la validation des milieux de culture dans l'industrie pharmaceutique.

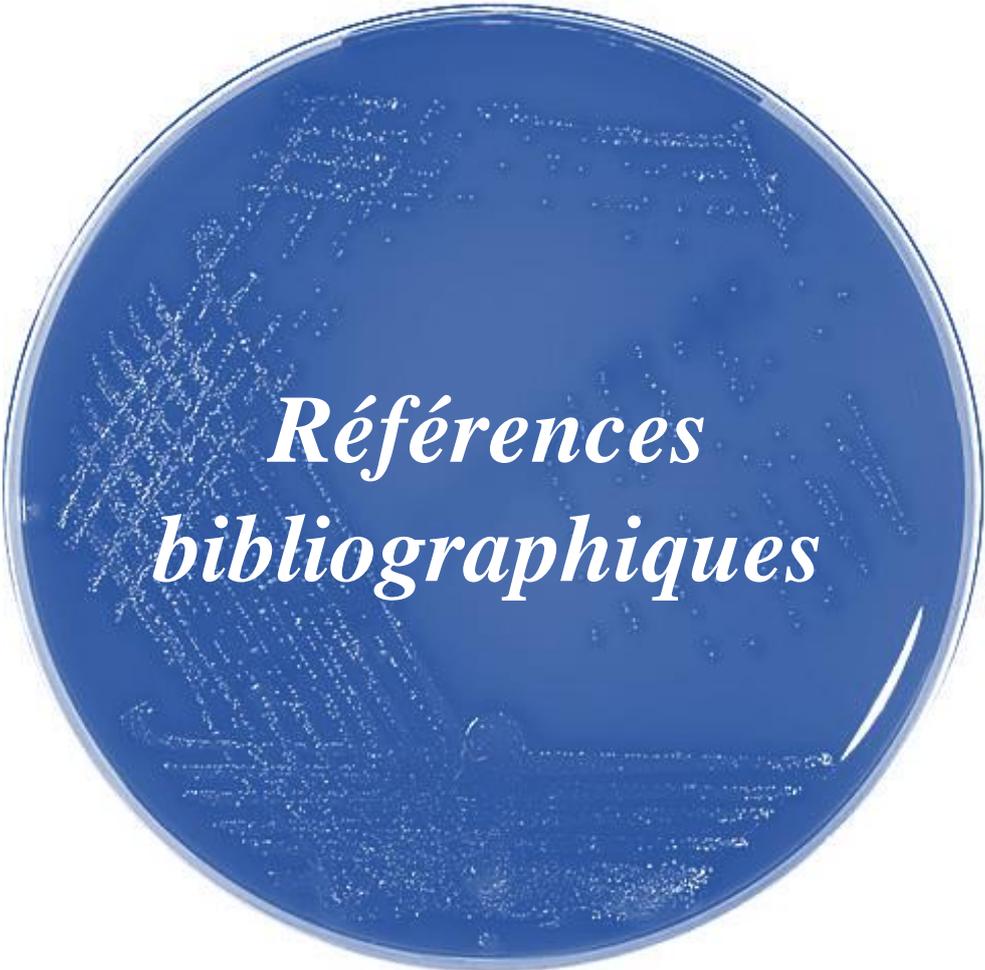
Afin de réaliser cette validation, plusieurs souches ont étéensemencées (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.....) sur différents milieux culture.

Parmi les essais microbiologiques réalisés, le contrôle de stérilité, dont il a montré l'absence totale des microorganismes et ce pour tous les milieux de culture testés.

D'autre part, le test de fertilité qui a donné des valeurs confinées entre 50 et 200 UFC avec différents aspects en cas des milieux sélectifs.

En outre nous avons constaté que le développement des souches microbiennes dans les résultats obtenus signifie que les analyses effectuées sur les milieux sont conformes aux critères d'acceptation.

A la lumière des résultats obtenus dans notre étude, nous pouvons conclure que les milieux de culture préparés sont validés et peuvent être utilisés pour des tests ultérieurs.



*Références
bibliographiques*

H :

Haider S.I., (2006). Validation Standard Operating Procedures, second edition, A Step by Step Guide for Achieving Compliance in the Pharmaceutical, Medical Device, and Biotech Industries. P : 3-11.

I :

ISO, (2014). Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau, Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture.

<https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:53610:fr>

O :

OPTMQ, (2017). Guide de Microbiologie. P : 24-25

P :

Pharmacopée Européenne, (2013). Chapitre 2.6.13 : Recherche de Microorganismes Spécifiés. 8ème édition. P :

R :

Raynaud M., (2011). Validation du Procédés de Fabrication dans l'Industrie Pharmaceutique, Appliquée aux Formes Solides Orales. P : 37-39.

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

S :

Sandle T., (2016). Pharmaceutical Microbiology, Essentials for Quality Assurance and Quality Control. P : 47.

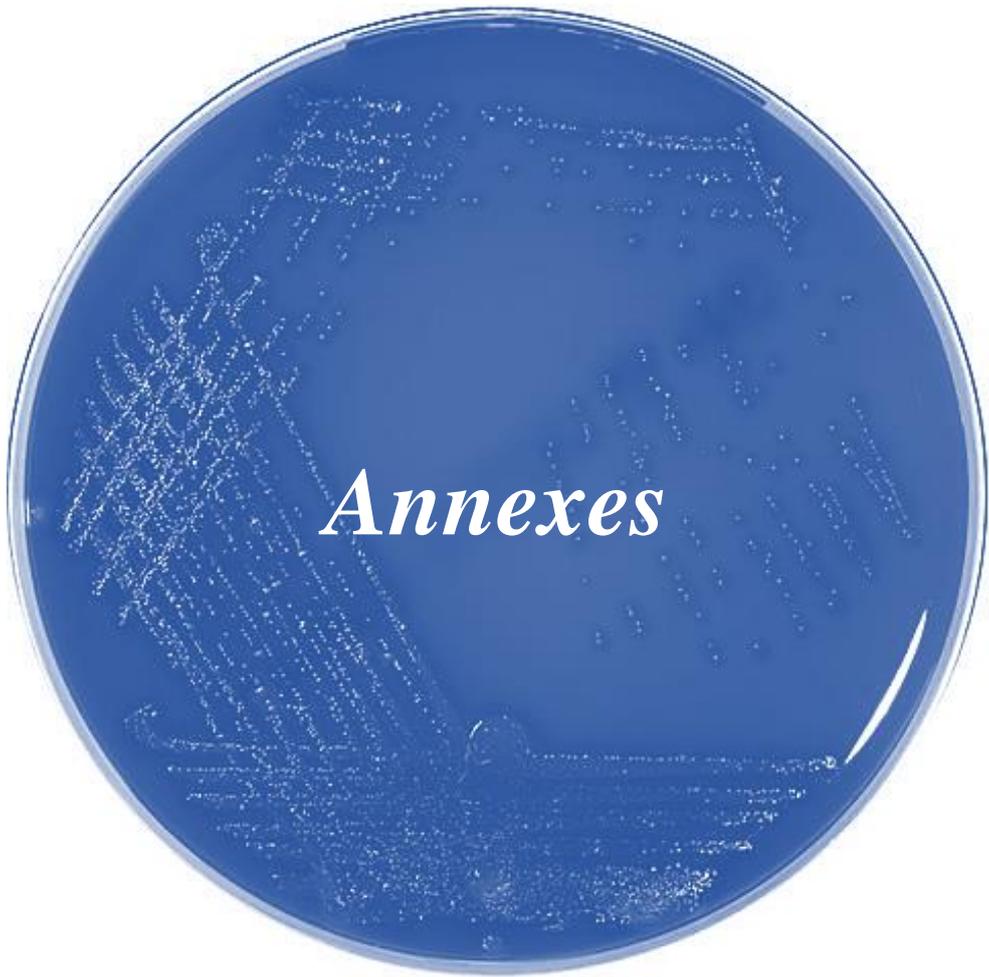
SOMIPEV, (2017). Guide Pratique de Bactéries Pathogènes. P : 26-69.

Z :

Zimbro M.J, Power D.A., Miller S.M., Wilson G.E., et Johnson J.A., (2009). Difco & BBL Manual, Manual of Microbiological Culture Media, 2ème Edition. P: 4-5.

[1] Labtoo. <https://www.labtoo.com/fr/>

- [2] Linternaute. <http://www.linternaute.fr/expression/langue-francaise/15969/culture-microbienne/>
- [3] Magazinesciences. <https://www.magazinescience.com/biologie/milieus-de-culture-techniques-densemencement/>
- [4] cdc. www.cdc.gov > **chapitre-11-contrôle-de-qualité-des-milieus-et-réactifs**
- [5] Wickhamlabs. <https://wickhamlabs.co.uk/>
- [6] Bd. <https://www.bd.com/fr-fr>
- [7] Technobio. <http://www.technobio.fr/>
- [8] Fao. <http://www.fao.org/3/V9952F/v9952f04.htm>
- [9] Microbiologyinfo. <https://microbiologyinfo.com/?s=fertilit%C3%A9+milieu+de+culture>
- [10] Lustiner. <https://www.lustiner.com/>
- [11] Austincc. https://www.austincc.edu/microbugz/mannitol_salt_agar.php



Annexe 1 : Définitions

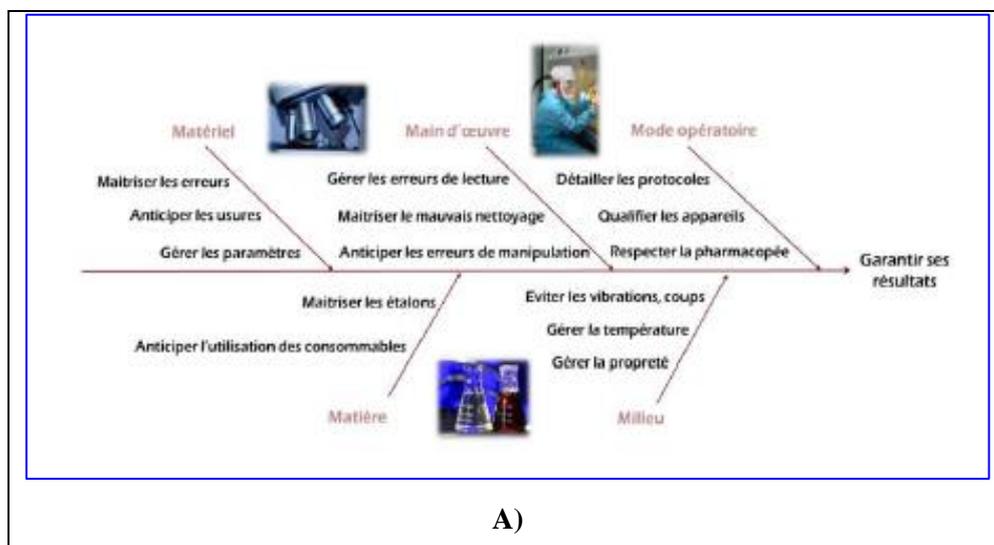
➤ Qualité

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

➤ Modalités de maîtrise des risques "5M"

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

Le diagramme en arêtes de poisson est le fruit de Karou Ishikawa ingénieur chimiste japonais précurseur et un des théoriciens pour la gestion de la qualité (A : Principaux facteurs de variations d'une analyse).



Chaque famille commence en effet par la lettre M :

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

➤ **Assurance qualité**

L'assurance qualité des médicaments regroupe toutes les mesures prises pour garantir qu'un médicament est sûr, efficace et en bonne qualité (acceptable pour le patient).

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

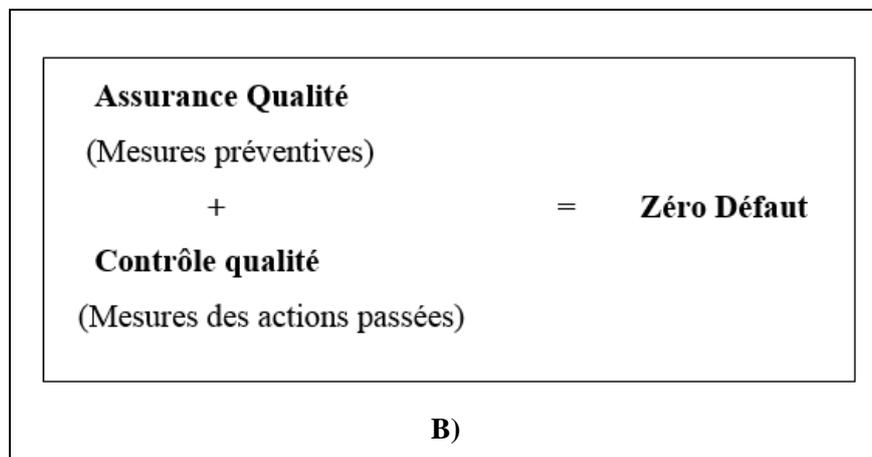
Ils permettent de vérifier que des caractéristiques sont conformes à des spécifications préétablis.

➤ **Bonnes pratiques de fabrication**

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

➤ **Contrôle qualité**

Le contrôle de la qualité fait partie des bonnes pratiques de fabrication ; il concerne l'échantillonnage, les spécifications, le contrôle, ainsi que les procédures d'organisation, de documentation et de libération qui garantissent que les analyses nécessaires et appropriées ont réellement été effectuées et que les matières premières, les articles de conditionnement et les produits ne sont pas libérés pour l'utilisation, la vente ou l'approvisionnement sans que leur qualité n'ait été jugée satisfaisante (B : Concept de qualité totale).



➤ **Pharmacopée Européenne**

La Pharmacopée Européenne est un ouvrage de référence unique en matière de contrôle qualité des médicaments au sein des pays signataires de la Convention relative à son élaboration.

➤ **ISO**

L'Organisation internationale de normalisation est un organisme de normalisation international composé de représentants d'organisations nationales de normalisation de 164 pays.

➤ **ATCC**

L'American Type Culture Collection (ATCC) est une société privée américaine sans but lucratif, centre de ressources biologiques, dont la mission se concentre sur l'acquisition, l'authentification, la production, la conservation, le développement et la distribution de la norme de référence de micro-organismes, les lignées cellulaires et d'autres matériaux pour la recherche dans les sciences de la vie.

➤ **EMA**

L'Agence européenne des médicaments (EMA) contribue à protéger et à promouvoir la santé humaine et animale en évaluant et en contrôlant les médicaments au sein de l'Union européenne (UE) et de l'Espace économique européen (EEE).

➤ **FDA**

La Food and Drug Administration est l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments.

➤ **LNCPP**

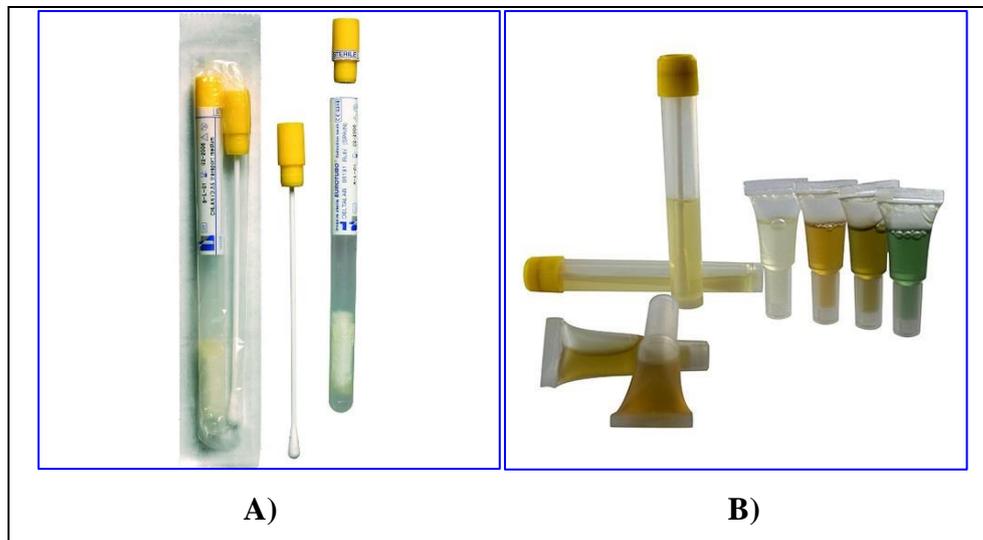
Le laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques est un établissement public à caractère administratif, doté de la personnalité morale et de l'autonomie financière, placé sous la tutelle du ministère chargé de la santé.

➤ **USP**

La United States Pharmacopeia est une pharmacopée pour les États-Unis publiée chaque année par la United States Pharmacopeial Convention, une organisation à but non lucratif qui détient la marque et détient également le droit d'auteur sur la pharmacopée elle-même.

Annexe 2 : Types des milieux de culture

- **Classification des milieux de culture** (A : Milieu de transport ; B : Milieu en ampoule).





Résumé

Résumé

Dans ce travail, nous avons mis en œuvre les nouvelles exigences de la Pharmacopée européenne, qui assurent la validation des milieux de culture avant leurs utilisations. Notre étude s'intéresse à la validation des milieux de culture dans le laboratoire de contrôle qualité de l'UPC dont l'objectif est d'obtenir des milieux de bonne qualité et de veiller leur conformité à la suite de plusieurs chevauchements avec les analyses microbiologiques. Pour atteindre cet objectif, des contaminations artificielles sont réalisées par quelques souches microbiennes bien définies afin de vérifier la fertilité des milieux avec l'application des témoins de stérilité dans des conditions d'asepsie totale. Parmi les essais microbiologiques réalisés, le contrôle de stérilité, dont il a montré l'absence totale des microorganismes et ce pour tous les milieux de culture testés. D'autre part, le test de fertilité qui a donné des valeurs confinées entre 50 et 200 UFC avec différents aspects en cas des milieux sélectifs. En outre nous avons constaté que le développement des souches microbiennes dans les résultats obtenus signifie que les analyses effectuées sur les milieux sont conformes aux critères d'acceptation.

Mots clé : validation, milieux de culture, microorganismes, fertilité, stérilité, performances.

ملخص

في هذا العمل ، قمنا بتنفيذ المتطلبات الجديدة لدستور الأدوية الأوروبي ، والتي تضمن التحقق من صحة وسائط الثقافة قبل استخدامها. تركز دراستنا على التحقق من صحة وسائط الاستنبات في مختبر مراقبة الجودة التابع لـ UPC ، والذي يتمثل هدفه في الحصول على وسائط عالية الجودة وضمان امتثالها بعد عدة تداخلات مع التحليلات الميكروبيولوجية. لتحقيق هذا الهدف ، يتم تنفيذ التلوثات الاصطناعية بواسطة عدد قليل من السلالات الميكروبية المحددة جيدًا للتحقق من خصوبة الوسائط من خلال تطبيق ضوابط العقم في ظل ظروف التعقيم الكلي . من بين الاختبارات الميكروبيولوجية التي تم إجراؤها ، أظهر التحكم في العقم الغياب التام للكائنات الحية الدقيقة لجميع الأوساط المزروعة التي تم اختبارها. من ناحية أخرى ، فإن اختبار الخصوبة الذي أعطى قيمًا محصورة بين 50 و 200 و.ت.م (وحدة تشكيل المستوطنة) مع جوانب مختلفة في حالة الوسائط الانتقائية . بالإضافة إلى ذلك ، وجدنا أن تطور السلالات الميكروبية في النتائج التي تم الحصول عليها يعني أن التحليلات التي أجريت على الوسائط تتوافق مع معايير القبول.

الكلمات المفتاحية: التحقق ، وسائط الزرع ، الكائنات الحية الدقيقة ، الخصوبة ، العقم ، الأداء.

Abstract

In this work, we have implemented the new requirements of the European Pharmacopoeia, which ensure the validation of culture media before their use. Our study focuses on the validation of culture media in the quality control laboratory of the UPC, whose objective is to obtain good quality media and to ensure their compliance following several overlaps with microbiological analyses. To achieve this objective, artificial contaminations are carried out by a few well-defined microbial strains in order to verify the fertility of the media with the application of sterility controls under conditions of total asepsis. Among the microbiological tests performed, the sterility control has shown the total absence of microorganisms for all the culture media tested. On the other hand, the fertility test which gave values confined between 50 and 200 CFU with different aspects in case of selective media. In addition, we found that the development of microbial strains in the results obtained means that the analyses carried out on the media comply with the acceptance criteria.

Key words: validation, culture media, microorganisms, fertility, sterility, performance.

BENHAFED Hibaterrahmane	Date de soutenance : /09/2020
Theme : Validation des milieux de culture dans le laboratoire pharmaceutique UPC	
Département : Biologie Appliquée Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie Filière : Sciences Biologiques Spécialité : Bioindustrie, Analyses et Contrôle	
Résumé <p>Dans ce travail, nous avons mis en œuvre les nouvelles exigences de la Pharmacopée européenne, qui assurent la validation des milieux de culture avant leurs utilisations. Notre étude s'intéresse à la validation des milieux de culture dans le laboratoire de contrôle qualité de l'UPC dont l'objectif est d'obtenir des milieux de bonne qualité et de veiller leur conformité à la suite de plusieurs chevauchements avec les analyses microbiologiques. Pour atteindre cet objectif, des contaminations artificielles sont réalisées par quelques souches microbiennes bien définies afin de vérifier la fertilité des milieux avec l'application des témoins de stérilité dans des conditions d'asepsie totale. Parmi les essais microbiologiques réalisés, le contrôle de stérilité, dont il a montré l'absence totale des microorganismes et ce pour tous les milieux de culture testés. D'autre part, le test de fertilité qui a donné des valeurs confinées entre 50 et 200 UFC avec différents aspects en cas des milieux sélectifs. En outre nous avons constaté que le développement des souches microbiennes dans les résultats obtenus signifie que les analyses effectuées sur les milieux sont conformes aux critères d'acceptation.</p>	
Mots clé : validation, milieux de culture, microorganismes, fertilité, stérilité, performances.	
Laboratoire de : Contrôle de qualité de l'Union Pharmaceutique Constantinoise (UPC)	
Président de jury : Mr.KACEM CHAOUCHE N. Rapporteur : Mme. BENCHIHEUB M. Examineur : Mme. BATAICHE I. Maitre du stage : Mme. DIB Amani	UFM. Constantine 1. UFM. Constantine 1. UFM. Constantine 1. Responsable service de microbiologie UPC