

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

Université A. Mira –Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

Filière :Sciences biologiques

Option : Génie Biologique



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme

## **Master**

### *Thème*

**Contrôle microbiologique d'une formule  
humide d'un antibiotique.**

Présenté par :

BELHADAD Siham et HASSAM Nadia

Soutenu le : 24/06/2017

Devant le Jury composé de :

Mr. MOUSSAOUI Bilal

MAA

Examinateur

Mr. KECHA Mouloud

Professeur

Encadreur

Mr. BENDJEDDOU Kamel

MCB

President

**Année Universitaire : 2016/2017**

# *Remerciement*

*Nous remercions en premier lieu DIEU le tout puissant de nous avoir donné la santé, le courage et la volonté pour accomplir cet humble travail.*

*Nous avons l'honneur et le plaisir de présenter notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre encadreur Professeur KECHA MOULOUD, pour sa précieuse aide, ces orientations et le temps qu'il nous a accordé pour notre encadrement.*

*Nous remercie les membres du jury Mr BENDJEDOU et Mr MOUSSAOUI pour avoir accepté d'examiner ce document. Et à tous les enseignants qui nous ont encouragés et soutenus pendant notre cursus.*

*Nous remercions également tous ceux qui ont contribué de prêt ou de loin à la réalisation de notre mémoire.*

*SIHAM et NADIA*



# *Dédicace*

*Je dédie ce travail à mes chères parents mon papa ZAHIR et ma mère REBIHA 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 ma sœurs DALILA*

*Et mes frères YUBA et KOUCEILA*

*A mon oncle KARIM et sa femme LINDA*

*A MOUHAMED qui m'a aidé*

*A SIHAM avec elle j'ai partagé des moments inoubliables*

*A OURIDA et tous mes collègues et amies.*

*NADIA*



# *Dédicace*

*Je dédie ce travail à mes très chères parents, sans  
eux ce travail n'aurait jamais vu le jour*

*A mes frères qui m'ont toujours soutenu*

*A ma sœur adorable*

*A mes amis*

*Merci pour les moments que nous avons passés  
ensemble*

*A ma binôme Nadia*

*SIHAM*



## *Liste d'abréviations*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

MLS : Macrolides Lincosamides Streptogramines.

SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticiline.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticiline.

*E. coli* : *Escherichia coli*.

ORL : Oto-Rhino-laryngologie.

SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience.

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien.

ISO : International Organization for Standardization (Organisation International de Normalisation).

AFNOR : Agence Française de Normalisation.

TSE : Tryptophane Sel Eau.

SFB : Bouillon sélénite cystéine.

NPP : Nombre le plus probable.

TSE : Tryptophane sel eau

FTAM : Flore totale aérobie mésophile.

BCPL : Bouillon lactosé au pourpre de bromochrésol.

VRBG : Gélose Violet Rouge Bile glucose.

GN : Gélose nutritive.

SS : Gélose Salmonella-Shigella

DO : Densité optique.

UFC : Unité formant colonies.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

MUI : Milli unité international.

BFP : Bonne Pratique de Fabrication.

## Liste des figures

**Figure1** :Structure de la spiramycine.

**Figure 2** : le médicament « ROVADAL® 0,375 MUI/5ml»

**Figure 3** : protocole de l'analyse microbiologique

**Figure 4**: Observation d'un champignon sous microscopique optique.

**Figure 5**: Résultats de la CMI de la spiramycine sur les souches testés.

## *Liste des tableaux*

**Tableau I** : les trois types de spiramycines suivant le radical.

**Tableau II** : composition de ROVADAL® 0,375 MUI/5 ml.

**Tableau III** : Les souches de référence

**Tableau IV** : Résultat du dénombrement des levures et les moisissures.

**Tableau V** : Résultats du contrôle microbiologique du ROVADAL® 0,375 MUI/5 ml.

**Tableau VI** : Les concentrations minimales inhibitrices de la spiramycine sur SARM, SASM et *Bacillus subtilis*.

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

## Sommaire

|  |   |
|--|---|
| Introduction .....                                       | 1 |
| Chapitre 1 : synthèse bibliographique                    |   |
| I. Notions sur les médicaments .....                     | 3 |
| I.1.Définition.....                                      | 3 |
| I.2.Composition.....                                     | 3 |
| II. Généralité sur les antibiotiques .....               | 3 |
| II.1.Définition.....                                     | 3 |
| II.2.Classification .....                                | 4 |
| II.3.La famille des macrolides .....                     | 5 |
| II.3.1.Définition .....                                  | 5 |
| II.3.2.Les apparentés aux macrolides .....               | 5 |
| II.3.2.Mécanisme d'action .....                          | 6 |
| II.3.3.Spectre antibactérien.....                        | 6 |
| II.3.4.Propriétés physico-chimiques des macrolides.....  | 7 |
| II.3.5Indications thérapeutiques.....                    | 7 |
| II.4.La spiramycine .....                                | 7 |
| II.4.1.Définition.....                                   | 7 |
| II.4.2.Structure et propriétés physico-chimiques .....   | 8 |
| II.4.3.Propriétés pharmacocinétiques .....               | 8 |
| III. Contrôle d'un médicament de la famille de Macrolide |   |
| « ROVADAL®0,375MUI/5ML » .....                           | 9 |
| III.1.Contrôle de qualité d'un médicament .....          | 9 |

|  |    |
|--|----|
| III.2.Présentation de médicament à analyser..... | 10 |
|--|----|

## Chapitre II : matériels et méthodes

|  |    |
|--|----|
| I. Contrôle microbiologique .....                                  | 11 |
| I.1.Les germes recherchés .....                                    | 11 |
| I.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....                          | 11 |
| I.1.2. Salmonelles .....   | 11 |
| I.2.Les germes dénombrés .....                                     | 12 |
| I.2.1.Entérobactéries .....  | 12 |
| I.2.2.Flore totale aérobie mésophile.....                          | 12 |
| I.2.3.Levures et moisissures .....                                 | 12 |
| I.3.Détermination des concentration minimal inhibitrice (CMI)..... | 14 |
| I.3.1.Standardisation de l'inoculum.....                           | 14 |

## Chapitre III : Résultats et discussion

|  |    |
|--|----|
| I. Résultats.....  | 15 |
| I.1. Résultats du contrôle de la qualité microbiologique ..... | 15 |
| I.1.1.Aspect macroscopique .....                               | 15 |
| I.1.2.Aspect microscopique .....                               | 16 |
| I.2.Résultats de la CMI .....                                  | 17 |
| II.Discussion .....  | 18 |

## Conclusion

## Références bibliographiques

## Annexe



# Introduction

Le marché pharmaceutique des médicaments ne cesse de connaître un essor grandissant et les industriels multiplient les gammes afin d'une part augmenter leur bénéfice et d'autre part, répondre à la demande des patients.

Plusieurs types de médicaments ont été produits jusqu'à maintenant et des recherches se font pour répondre aux situations de résistance à une infection ou maladie nouvelle.

Parmi tous les médicaments connus et ayant prouvés leur efficacité thérapeutique, figurent les antibiotiques qui sont largement utilisés à travers le monde pour traiter les infections bactériennes. Ils peuvent se présenter sous plusieurs formes (comprimés, ampoules, sirop ...) et peuvent être administrés de différentes façons.

Ce produit pharmaceutique est sensé guérir un mal et non pas l'engendrer ; très réglementé dans sa fabrication et sa commercialisation qui sont soumises à des contrôles et à des autorisations émanant des autorités compétentes.

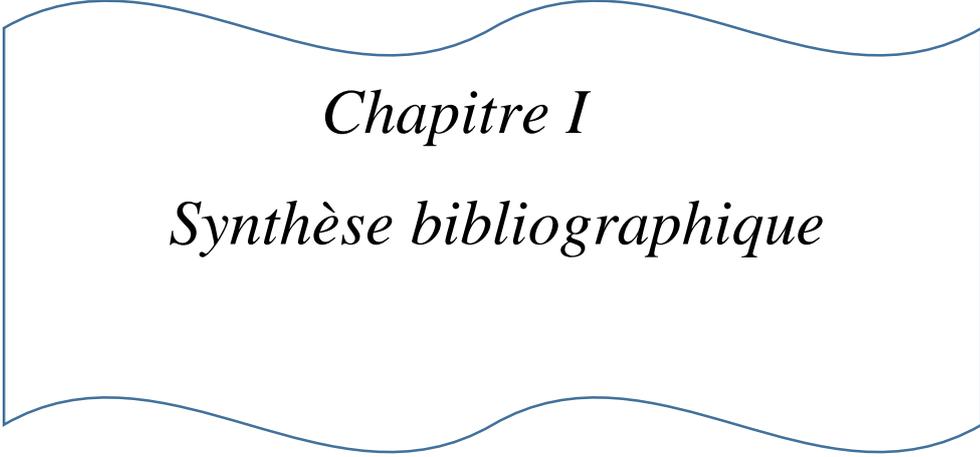
Il y a de nombreuses façons de tester la qualité des médicaments, les normes de qualité reconnues concernent en particulier sa composition, sa teneur en substances actives, son identité, son innocuité, sa quantité, sa date de fabrication et de péremption. (Le Hir, 2006).

Vu l'importance de contrôle des médicaments, ce travail a pour objet le contrôle microbiologique d'un produit fini de médicament (antibiotique) sous forme humide fabriqué en Algérie par SAIDAL destiné aux nourrissons, dans le but d'identifier tout agent nuisible et d'assurer sa qualité pendant la durée indiquée sur l'emballage.

Afin de parvenir à notre objectif, nous avons structuré notre plan de travail en trois chapitres :

Une synthèse bibliographique où on aborde des notions générales sur les médicaments, sur les antibiotiques, une perspective sur un contrôle de qualité d'un médicament et aussi présentation du médicament à analyser « ROVADAL® 0,375 MUI/5 ml »

Partie pratique qui comporte un contrôle microbiologique et une technique pour la détermination de la CMI et enfin résultats et discussion..



*Chapitre I*  
*Synthèse bibliographique*

## **I. Notions sur les médicaments**

### **I.1. Définition**

Selon l’OMS on entend par médicament : « toute substance ou composition préparé et présenté pour guérir ou prévenir les maladies humaines ou animales ainsi que tout produit pouvant être administré à l’homme ou à l’animal en vue d’établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier des fonctions organiques .Ils peuvent provenir de végétaux, d’animaux, de microorganismes ou par synthèse.

### **I.2. Composition**

#### **I.2.1. Principes actifs ou substances actives**

Une substance qui peut être d’origine biologique, minérale ou organique naturelle ou synthétique, qui est distinguée par un mécanisme d’action curatif ou préventif bien précis dans l’organisme (Landry, 2012).

#### **I.2.2. Excipient**

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

#### **I.2.3. Additif**

Divers additifs entrent dans la composition des médicaments pour différentes raison, on en trouve les conservateurs antimicrobiens et les antioxydants, ils sont utilisés pour améliorer la conservation donc, augmenter la durée de vie des médicaments, soit en retardant l’oxydation de principes actif et excipient ou soit en réduisant la prolifération microbienne (Alais et Linden, 1997).

## **II.Généralités sur les antibiotiques**

### **II.1. Définition**

Les antibiotiques sont des substances chimiques d’origine naturelle, synthétique ou semi-synthétique n’agissent que contre les bactéries en bloquant leur multiplication (effet

bactériostatique) ou en les tuant (effet bactéricide) par différents modes d'action (Barzic et Ioan, 2015). Ils ont une toxicité sélective ;ils sont toxiques pour les bactéries mais pas pour l'organisme cible (Merad et Merad, 2001).

## **II.2. Classification**

Ils peuvent être classés selon plusieurs critères dans lesquels ils sont groupés en plusieurs familles et sous familles possédant un certain nombre de caractères communs : composition chimique, origine apparentée, spectre d'action similaire, mécanisme d'action identique, comportement pharmacologique souvent similaire.

### **II.2.1. Selon l'origine**

On distingue selon Neuman(1990), trois cas :

- ✓ **Extractive (naturelle)** : essentiellement
  - Bactérienne : par des Bacillus, bactéries non filamenteuse, (bacitracine) ou par des bactéries filamenteuses : actinomycètes (céfamycine, macrolides),
  - Fongique :Penicillium(Pénicilline, céphalosporines...)
- ✓ **Semi synthétique**

À partir d'une structure de base obtenue par extraction (fermentation) sur laquelle a été greffé un radical chimique (cas de la pénicilline).
- ✓ **Synthétique**

Produit entièrement par voie chimique (sulfamides)

### **II.2.2. Selon le spectre d'activité**

Le spectre d'activité est l'ensemble des germes sensibles à chaque famille d'antibiotique. On trouve des antibiotiques à spectre très large, large, moyen ou étroit. (Neuman,1990).

### **II.2.3.Selon le mode d'action**

Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une étape métabolique indispensable à la vie de la bactérie. Ils agissent par :

- Toxicité sélective au niveau de la synthèse de la paroi bactérienne, de la membrane cytoplasmique, de la synthèse des protéines et des acides nucléiques.
- Inhibition compétitive : dans ce cas, l'antibiotique est un analogue structural, il interfère avec une fonction essentielle à la bactérie (Sulfamide, dans la synthèse de l'acide folique) (Barzic and Ioan, 2015 ; Gaudy et Buxeraud, 2005)

#### **II.2.4. Selon la structure chimique**

Très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle  $\beta$  lactame), sur laquelle il y a hémi synthèse, et aussi ils peuvent être classés selon les acides aminés de la manière suivante : dérivés d'un seul acide aminé : (chloramphénicol), ou dérivés de deux acides aminés sous forme de peptide cyclique, complexe glycoprotéique... (Neuman, 1990).

### **II.3. La famille des macrolides**

#### **II.3.1. Définition**

Les macrolides sont des antibiotiques qui se caractérisent par un macrocycle lactone sur lequel est fixé un ou (plusieurs) sucre (s) aminé (s) ou neutre (s), composé de 12 à 16 atomes et pas d'atome d'azote (Agouridas C. et al., 1999 ; Bryskier et Bergogne-Berezin, 1999)

Obtenus par fermentation des *Streptomyces* ou bien par modification de l'érythromycine (Jain et Danziger, 2004), premier macrolide isolé de *Streptomyces erythreus* de puis plus de 50 ans (McGuire et al., 1952).

#### **II.3.2. Les apparentés aux macrolides**

Certains antibiotiques sont apparentés aux macrolides : lincosamides et streptogramines (synergistines) qui sont regroupés dans une classe à part dans certaines classifications ; Ces antibiotiques dits MLS (Macrolides, Lincosamides et Streptogramines) ont le même mécanisme d'action ainsi que les mêmes mécanismes de résistance et un spectre antibactérien rapproché mais ils diffèrent par leur structure (Buxeraud et Faure, 2016 ; Roland et Patrice, 1991).

La structure chimique des streptogramines est complexe, elle comprend :

Les streptogramines du groupe A, dont la structure est constituée d'un macrolactone peptidique, proches des macrolides.

Les streptogramines du groupe B qui sont des polypeptides cyclique (Giovanni et Furneri, 2001)

Les lincosamides sont de structures chimique différente ne comportent pas de cycle lactone ; ils comportent un acide aminé, un sucre reliés entre eux par une liaison amide (Bernard et *al.*, 1999).

### II.3.3. Mécanisme d'action

Les macrolides agissent en inhibant la synthèse protéique bactérienne. Ils se fixent sur la sous-unité 50 S, au niveau du site P du ribosome. Ils empêchent ainsi le transfert du complexe peptidyl-ARNtr depuis le site P vers le site A, ce qui entraîne une inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique (Faure, 2008).

### II.3.4. Spectre antibactérien

Généralement les macrolides sont actifs sur les germes à développement intracellulaire et parasites (Bryskier et Bergogne-Berzin, 1999)

Selon Etienne-Selloum et Faure (2015) ; Vidal (2017), ils ont un spectre étroit essentiellement sur certains :

- ✓ Bactéries à Gram positif comme les streptocoques et les staphylocoques sensible à la méticilline (SASM), les staphylocoques Résistante à la méticilline (SARM), les cocci à Gram négatif (*Neisseria meningitidis*),
- ✓ Bacilles à Gram négatif (*Bordetella...*),
- ✓ Bactéries responsables d'infections respiratoires et génitales comme *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydia trachomatis*,...
- ✓ Parasites comme *Toxoplasma gondii* (protozoaire responsable de la toxoplasmose) et *Pneumocystis carinii* (champignon responsable de la pneumocystose).

Ils sont inactifs sur :

- ✓ les Entérobactéries, les Pseudomonas, les Acinetobacter, pneumocoques... (Yala *et al.*, 2012)

### **II.3.5. Propriétés physico-chimiques des macrolides**

Ce sont des hétérosides lipophiles de poids moléculaire élevé, Ce sont des bases faibles, présentées sous forme de poudre très peu soluble dans l'eau (Bernard *et al.*, 1999).

### **II.3.6. Indications thérapeutiques**

Principalement administrés pour :

- ✓ Les infections ORL et les angines à streptocoques chez les patients intolérants aux pénicillines
- ✓ Les infections dermatologiques : impétigo, érysipèle, acné ...
- ✓ Les infections dentaires,
- ✓ Les infections buccales,
- ✓ Les infections urogénitales : les macrolides traitent de nombreuses maladies sexuellement transmissibles Dans les complications infectieuses du SIDA, on utilise l'azithromycine en prévention et la clarithromycine en traitement curatif.
- ✓ Ils peuvent être administrés aussi en toutes circonstances : au cours d'une insuffisance rénale, pendant la grossesse, dans le traitement de la toxoplasmose (généralement on préconise la spiramycine) (Etienne-Selloum et Faure, 2015).

Les principaux macrolides commercialisés sont : l'érythromycine, la Clarithromycine, Azithromycine, Josamycine et Spiramycine... (Gaudy et Buxeraud, 2005).

## **II.4. La Spiramycine**

### **II.4.1. Définition**

La spiramycine est un antibiotique de la famille des macrolides où le cycle lactonique est composée de 16 atomes (Hansen *et al.*, 2002), produite par fermentation de *Streptomyces ambofaciens* (Pinnert-Sindico, 1954).

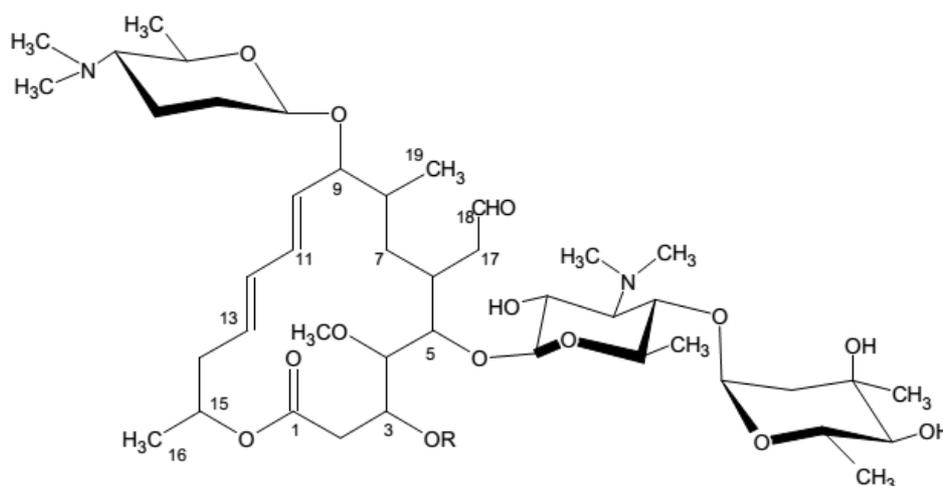
## II.4.2. Structure et propriétés physico-chimiques de la spiramycine

La spiramycine est un solide amorphe, soluble dans la plupart des solvants organiques et légèrement soluble dans l'eau. (Buntrock, 2013)

**Tableau I** : les trois types de spiramycine suivant le radical (Selon pub chem, 2017)

| Spiramycine     | Le radical   | Formule chimique        | Poids moléculaire |
|-----------------|--|-------------------------|-------------------|
| Spiramycine I   | Alcool (OH)  | $C_{43}H_{74}N_2O_{14}$ | 843.052g/mol      |
| Spiramycine II  | Ester acétique(COCH <sub>3</sub> )                     | $C_{45}H_{76}N_2O_{15}$ | 885.089g/mol      |
| Spiramycine III | Ester propionique (COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) | $C_{46}H_{78}N_2O_{15}$ | 899.15g/mol       |

Sa structure chimique est la suivante :



**Figure1** : Structure de la spiramycine(Hansen et *al.*,2002)

## II.4.3. Propriétés pharmacocinétiques de la spiramycine

Selon Duval J et Soussy J C (1990) et Vidal (2017)

### II.4.3.1.Absorption

L'absorption de la spiramycine est rapide, mais incomplète par le tractus gastro-intestinal après administration orale. Elle n'est pas modifiée par la prise d'aliments.

### **II.4.3.2.Distribution**

Elle se distribue largement dans l'organisme, son caractère lipophile leur accorde une excellente diffusion dans les tissus comme le poumon, le foie, la bile, les reins, ou les amygdales, mais il ne pénètre pas dans le LCR. La demi-vie plasmatique est voisine de 8 heures et la liaison aux protéines plasmatiques est faible (10 %).

### **II.4.3.3.Biotransformation**

La spiramycine est métabolisée dans le foie, le seul macrolide n'ayant pas d'effet inhibiteur enzymatique.

### **II.4.3.4.Élimination**

Après métabolisation hépatique on retrouve très peu dans les urines (10 % de la dose ingérée), leur élimination étant essentiellement biliaire.

## **III.Contrôle d'un médicament de la famille de Macrolide**

### **Le« ROVADAL® 0,375 MUI/5 ml»**

#### **III.1.Contrôle de qualité d'un médicament**

Le contrôle de la qualité est une série d'épreuves qualitatives : (contrôle microbiologique, toxicologique) et de dosage : (contrôle physico-chimique); consiste à vérifier que les caractéristiques sont conformes à des spécifications préétablies. Il se fait : Sur les intrants (les matières premières), en cours de fabrication : étapes intermédiaires (grains, comprimés avant pelliculage...) et en fin de fabrication : sur le produit fini (Mathieu et *al.*, 1996).

Les contrôles en laboratoire des produits pharmaceutiques sont basés sur des méthodes issues des directives européennes, des publications scientifiques ou des normes (ISO 8402, AFNOR...). Par exemple la norme ISO 9003 est utilisée lorsque les exigences du client ne concernent que le contrôle final.

La Pharmacopée ne parlait jusqu'ici que du contrôle microbiologique que pour les médicaments qui doivent être stériles. Il allait de soi que tous les autres devaient être aussi peu contaminés que possible et que les précautions nécessaires et des mesures appropriées doivent être prises pour assurer la qualité microbiologique du produit (Le Hir, 2006).

L'objectif du contrôle comme celui de tout essai de la pharmacopée est de vérifier qu'un produit particulier répond aux exigences de la Pharmacopée Européenne et garantir que les médicaments sont fabriqués selon des normes de qualité et que leur fabrication est documentée et contrôlée (Le Hir, 2006).

### III.2.Présentation de médicament à analyser



Ce médicament est un antibiotique qui appartient à la famille des macrolides connu sous le nom commercial Rovamycine®; ROVADAL® est la dénomination de marque retenue par SAIDAL.

Sa composition est donnée dans le tableau II

Ce médicament est de forme liquide (sirop), son avantage est sa meilleur biodisponibilité, donc action rapide car elle ne nécessite pas de dissolution dans le tube digestif.

**Figure 2 :** Le médicament

«ROVADAL® 0,375 MUI/5 ml »

**Tableau II :** composition de ROVADAL® 0,375 MUI/5 ml.

| Forme et dosage       | Principe actif             | excipients   |
|-----------------------|----------------------------|--|
| Sirop à 0.375 MUL/5ml | Spiramycine à 0.375MUL/5ml | Acide adipique, sorbate de potassium*, glycyrrhizinate d'ammonium, citrate trisodique*<br>dihydraté,saccharose*(3.5g/ml),caramel,eau purifiée.<br>Aromes : chocolat, chocolat-menthe et caramel. |



*Chapitre II*  
*Matériel et méthode*

Cette étude a été effectuée au niveau de laboratoire de microbiologie appliquée de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université d'Abderrahmane Mira de Bejaia. Elle s'est déroulée durant 3mois (du Mars au 31 mai 2017).

Le contrôle a consisté en particulier à l'analyse microbiologique de trois échantillons de produit fini d'antibiotique (Spiramycine) sous forme humide, ces échantillons ont été acquis directement auprès d'une pharmacie située à Bejaia fournis par SAIDAL.

## **I. Contrôle microbiologique**

Le contrôle de la qualité microbiologique du ROVADAL® 0,375 MUI/5 ml a été réalisé sur le produit fini dont le but de s'assurer de sa conformité. Les germes ont été recherchés et/ou dénombrés suivant la Pharmacopée Européenne 2014 avec quelques modifications.

Le dénombrement et la recherche des germes ont été réalisés à partir de la solution mère et de ses dilutions décimale allant de  $10^{-1}$  jusqu' à  $10^{-4}$  en utilisant différents milieux dont la composition est donnée en annexe (Annexe A).

### **I.1. Les germes recherchés**

#### **I.1.1. *Staphylococcus aureus***

Pour la mise en évidence de ces germes on a procédé comme suite :

Enrichissement : mettre 10 ml de la solution mère de l'antibiotique dans un volume de 10 ml de bouillon de Giolitti Contoni contenant de tellurite de potassium puis on ajoute de paraffine ; incubation à 37°C/24h.

Étalement en surface de 0,1 ml de la solution incubée sur Chapman, incubation à 37°C /24h

#### **I.1.2. Salmonelles**

La recherche de ces germes a été faite en 3 étapes :

Pré-enrichissement, aspiration avec une seringue stérile de 25 ml de l'antibiotique dans 225 ml de TSE, incuber à 37°C/18h ;

Enrichissement, transfert de 10 ml du mélange dans 10 ml de SFB, incubation à 37°C/24h ;

Isolement par ensemencement en surface de 0.51 ml de la solution sur milieu SS.

## **I.2. Les germes dénombrés**

### **I.2.1. Entérobactéries**

Sur milieu solide :

On a ensemencé en masse 1 ml de chaque dilution dans du milieu VRBG en double couche, incubé à 30°C/37h.

Sur milieu liquide : Dénombrement des coliformes fécaux et totaux par la technique NPP (nombre le plus probable).

Transfert de 1 ml de chaque dilution vers 9 ml du milieu BCPL, incubé à 37°C/24h.

Si le BCPL est positif, on transfère 1 ml vers milieu Schubert, incubé à 44°C/24h. puis on ajoute quelques gouttes du réactif de KOVAKS pour la production d'indole.

### **I.2.2. Flore totale aérobie mésophile (FTAM)**

Le dénombrement des FTAM est fait comme suit :

Ensemencement en masse de 1 ml de chaque dilution dans la gélose nutritive, incubation à 30°C/72h.

### **I.2.3. Levures et moisissures**

On ensemence en surface 1 ml à partir des dilutions décimales sur milieu Sabouraud, incubation à 25°C/5j.

Le procédé d'analyses microbiologiques est résumé dans le schéma suivant :

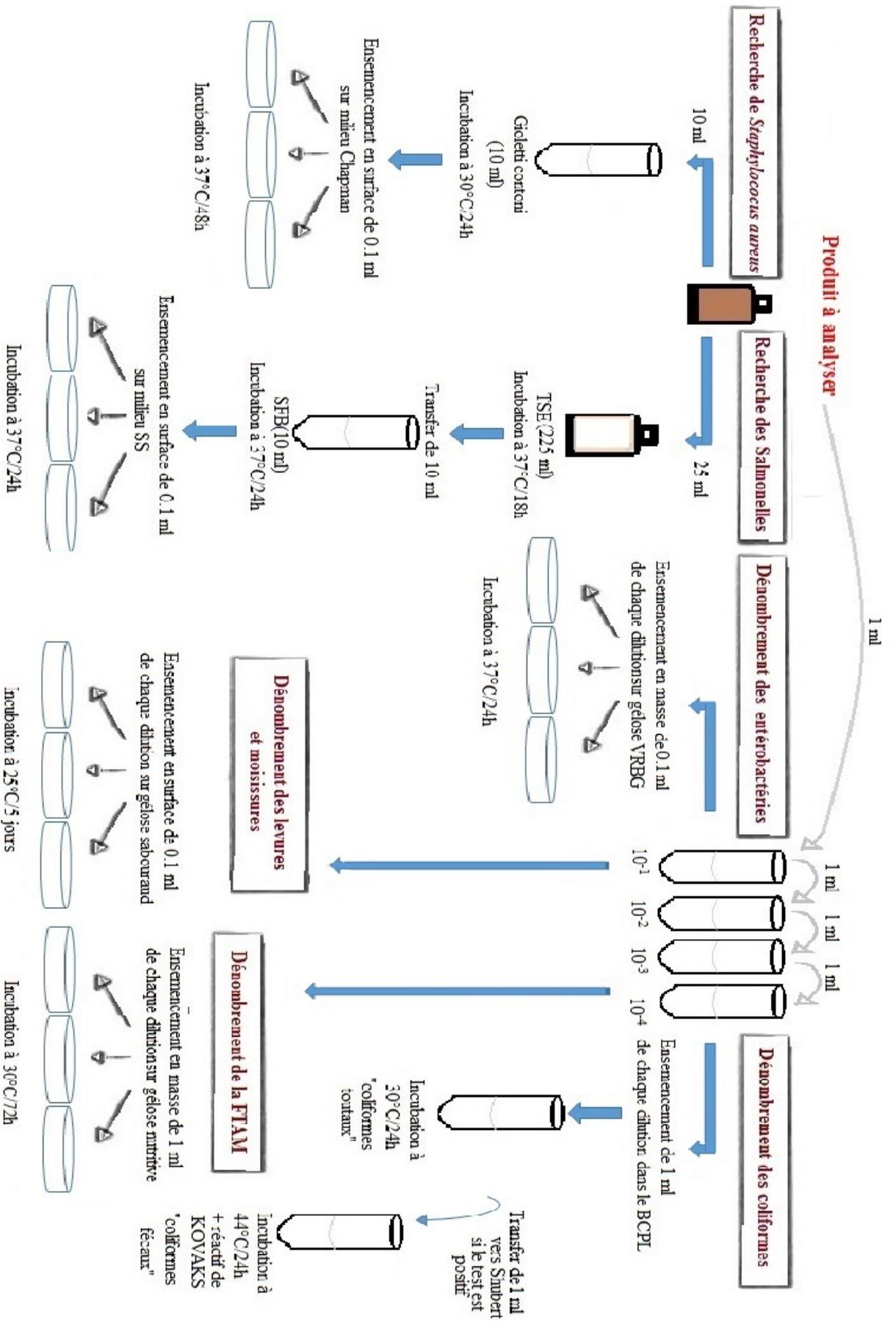


Figure 4: Protocole de l'analyse microbiologique

microcupules un volume de 100 µl de bouillon nutritive, des concentrations décroissantes d'antibiotiques (spiramycine) de volume de 50 µl et une suspension standardisée de la souche à tester pour chaque ligne. (C: SASM ,E: SARM ,G: *Bacillus subtilis*).

**Tableau III** : Les souches de référence.

| Souces                   | Références  | Origine                    |
|--------------------------|-------------|----------------------------|
| SASM                     | ATCCC 33591 | Institut Pasteur d'Algérie |
| SARM                     | ATCCC 3911  |                            |
| <i>Bacillus subtilis</i> | ATCC 6633   | SAIDAL Antibiotical        |

### I.3.1. Standardisation de l'inoculum

- Revivification de chacune des souches bactériennes dans des tubes de 5ml de bouillon nutritive pendant 18h incubées à 37°C,
- Ces souches sont ensemencées sur gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24h.
- On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies (bien isolées et identiques) de chacune des trois souches bactériennes à tester.
- On décharge l'anse dans 5ml d'eau physiologique, la suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à une DO de 0.08 à 0.10 à 580 nm soit  $10^7$ - $10^8$ UFC.
- Les valeurs d'absorbance correspondantes aux dilutions ayant le nombre de  $10^7$ UFC/ml pour chacune des souches ont été retenues pour préparer des cultures des 18h afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices sur microplaque (Haddouchi et al., 2009).



*Chapitre III*  
*Résultats et discussion*

## I. Résultats

### I.1. Résultats du contrôle de la qualité microbiologique

Dans ce qui suit, nous présentons les résultats obtenus après contrôle microbiologique de 03 échantillons de l'antibiotique à analyser.

#### I.1.1. Aspect macroscopique

##### ➤ Sur Chapman, SS, VRBG et BCPL

Pour les trois échantillons, aucune présence marquée des germes pathogènes *Staphylococcus aureus*, Salmonelles, Entérobactéries et coliformes. (Annexe B)

##### ➤ Sur Sabouraud

Observation d'un champignon immature de colonie de taille moyenne ayant de courts filaments, de couleur blanche. Une apparition rapide et abondante de conidies de couleur verte olive est constatée sans production de pigments.

##### ➤ Sur gélose nutritive

Quelques colonies de levures ont été observées de taille (environ 0.5mm à 2mm), de formes variables (rondes et ovales) lisses, légèrement bombé et de couleur crème.

Les dénombrements effectués sont résumés dans le tableau suivant

**Tableau IV :** Résultat du dénombrement des levures et les moisissures.

| Germes à dénombrer<br>Echantillon | FTAM      | levures et moisissures |
|-----------------------------------|-----------|------------------------|
| <b>1</b>                          | 16 UFC/ml | 13 UFC/ml              |
| <b>2</b>                          | 20 UFC/ml | 12 UFC/ml              |
| <b>3</b>                          | 10 UFC/ml | 9 UFC/ml               |
| <b>moyenne</b>                    | 15 UFC/ml | 11 UFC/ml              |

Le dénombrement des colonies est effectué en calculant la moyenne des colonies trouvées dans trois essais pour chaque échantillon, puis le nombre est multiplié par l'inverse de la dilution.

### I.1.2. Aspect microscopique

Le prélèvement du mycélium a été fait par la technique du scotch.



**Figure 3** : Observation d'un champignon sous microscopie optique (ZEISS West Germany) (grossissement x800) : (1) conidiophore ramifié, (2) branche, (3) métules, (4) phialides, et (5), (6) conidies

L'aspect (macroscopique et microscopique) du mycélium ressemble fortement à un *Penicillium*.

Les résultats sont récapitulés dans le tableau suivant :

**Tableau VI** : Résultats du contrôle microbiologique du ROVADAL® 0,375 MUI/5 ML (lot 0100)

| Tests                                      | Normes selon BPF | Résultats  |
|--|------------------|------------|
| Recherche des <i>Staphylococcus aureus</i> | Absence          | Absence    |
| Recherche Salmonelles                      | Absence          | Absence    |
| Dénombrement de la FTAM                    | ≤1000 UFC/ml     | 15 UFC/ml  |
| Dénombrement des levures et moisissures    | ≤1000 UFC/ml     | 11 UFC /ml |
| Dénombrement des Entérobactéries           | <100 UFC/g       | Absence    |
| Dénombrement des coliformes                | Absence          | Absence    |

## I.2. Résultats de CMI sur microplaques

La ligne T : des microcupules a servi de témoin pour le bouillon nutritive ;

Ligne C : Une croissance visible des colonies bactériennes (dépôt de cellules au fond des cupules) de SASM à partir de la 1/64<sup>ème</sup> dilution de la spiramycine ;

Ligne E : les souches de SARM ont marqué un dépôt de cellule à partir de la 1/32<sup>ème</sup> dilution.

Ligne G : le dépôt de cellulaire de *Bacillus subtilis* été apparu à partir de la 1/512<sup>ème</sup> dilution.

La CMI pour chaque souche est indiquée par un cercle dans la microplaque (figure 4).

Les résultats obtenus concernant les concentrations minimales inhibitrices dans le tableau V sont convertis de milli unité internationale (M UI/ml) vers  $\mu\text{g/ml}$  ; Ou` 3000 UI = 1mg.



**Figure 4 :** Résultats de la CMI de la spiramycine sur les souches testés

**Tableau V :** Les concentrations minimales inhibitrices de la spiramycine sur les germes suivants SARM, le SASM et *Bacillus subtilis*

| Souche testée            | CMI de la spiramycine obtenu ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\times 10^{-8}$ |
|--------------------------|--|
| SARM                     | 78   |
| SASM                     | 48   |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 39   |

Les résultats montrent que SARM est la souche la plus résistante avec une CMI de 78 $\mu$ g/ml, puis SASM en deuxième lieu de 48 $\mu$ g/ml. et enfin *Bacillus subtilis* qui a montré une faible résistance à la spiramycine avec une valeur de 39 $\mu$ g/ml.

## II. Discussion

Le dénombrement des FTAM sur GN a révélé une moyenne de 15 UFC/ml, celui des levures et des moisissures à indiquer une moyenne de 11 UFC/ml ces germes sont responsables de nombreux phénomènes d'altération enzymatiques (amylase, protéase, lipase,...) des produits alimentaires.

Les interprétations de ces résultats sont très diverses, elles peuvent être expliquées par l'usage des méthodes alternatives qui ne sont pas validées par les pharmacopées (milieux de cultures utilisés peuvent ne pas convenir au développement des micro-organismes présents); ou à des contaminations introduites au cours des manipulations, dans ce fait l'essai doit être réalisé dans de bonnes conditions aseptiques sous une hotte à flux laminaire ou dans un isolateur (Le Hir, 2006).

Cet antibiotique est un milieu acide très riche dans sa composition en matière organique (sucres) ce qui favorise la multiplication et la croissance des levures et moisissures qui sont des microorganismes acidophiles, donc un nombre important de ces germes doit être dénombré si les contaminations proviennent lors de la fabrication ; on exclut dans ce cas les contaminations provenant de la matière première et des dispositifs utilisés durant le processus de fabrication du médicament et celle issues de l'air, l'eau et les conditions de stockage.

L'absence des entérobactéries et les germes pathogènes *Staphylococcus aureus*, *Salmonelles* et *E.coli* ainsi que les valeurs du dénombrement des levures et des moisissures qui sont inférieures aux normes citées par la pharmacopée européenne 2014 sont dues au respect de bonnes pratiques de fabrication du médicament et à l'action de l'antibiotique lui-même .

## ***Conclusion***

Le contrôle effectué dans ce travail a permis de connaître la qualité microbiologique de produit fini «ROVADAL® 0,375 MUI/5 ml ».

D'après les résultats d'analyses nous avons constatés l'absence totale de germes pathogènes (*Staphylococcus aureus*, Salmonelles et *E. coli*) ; et la présence non significative des germes aérobies viables totaux et des levures et moisissures de moyenne de 15UFC/ml et 11UFC/ml respectivement. Les résultats obtenus répondent aux normescités par la Pharmacopée européenne 2014; qui est due :au respect de bonnes pratiques de la fabrication, l'efficacité du processus de nettoyage et de désinfection au cours de fabrication et le bon conditionnement du produit. Ainsi, nous avons confirmés la sensibilité des souches testées vis-à-vis de la Spiramycine.

Alors on conclue que le produit étudié présente une bonne qualité microbiologique.

## *Références bibliographique*

AIACHE J.M., AIACHE S., et RENOUX R., (1995), Initiation à la connaissance des médicaments, Masson, Paris ,2<sup>e</sup> édition, p.24

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

BARZIC, Andreea Irina., et IOAN, Silvia. (2015). Antibacterial Drugs — From Basic Concepts to Complex Therapeutic Mechanisms of Polymer Systems .In: Bobbarala V (Ed), Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials, Intech, pp.3-23.disponible sur: <http://dx.doi.org/10.5772/60755>

BERGOGNE- BEREZIN E., et BRYSKIER A. (1999).Macrolides In : BRYSKIER André. (Eds), antibiotiques agent antibactérien et antifongique. Edition : Ellipses, Paris, p499-561

BERNARD, E., BERGOGNE- BEREZIN E., et BRYSKIER, A. (1999). Macrolides et produits apparentés. In : BERGOGNE- BEREZIN E et DELLAMONICA P. (Eds), Antibiothérapie en pratique clinique.2<sup>ème</sup> édition. MASSON. Paris : pp. 184-194

BILLERBECK V G., MARQUIER P., ROQUES C., et VANIÈRE P. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Laboratoire de Bactériologie, virologie et microbiologie industrielle. *HygieneReview*, (2002); Vol.10, n°3, pp. 248-251

BUNTROCK, Robert E. Review of The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Journal of chemical education, (2013); Vol .90, n°9, p. 1621. Disponible sur <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed4005613>

BUXERAUD, Jacques., et FAURE, Sébastien. Les macrolides et les cyclines. Actualités pharmaceutiques. (2016), vol.55, pp.7-12. Disponible sur : <http://www.em-consulte.com/en/article/1076955>

DUVAL J., et SOUSSY C-J. (1990). Antibiothérapie.4<sup>ème</sup> édition : Masson. Paris : p 126.

ETIENNE-SELLOUM, Nelly., et FAURE, Sébastien. (2015). Du mécanisme d'action des médicaments à la thérapeutique. Elsevier Masson. Paris : p 344-349

FAURE, Sébastien. Les macrolides et apparentés. Actualités Pharmaceutiques. (2008); Vol 47, n° 478, p. 51-56

GAUDY, Catherine., et BUXERAUD, Jaque. (2005). antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. ELSEVIER. p.136.

HADDOUCHI Farah., LAZOUNI Hamadi Abderrahmane., MEZIANE Abdelkader., et BENMANSOUR Abdelhafid. Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. Afrique science, (2009) ; Vol.05, n°2, p. 246 – 259

HANSEN, Jeffrey L., et *al.* The structure of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. CellPress. (2002) ; Vol.10, n°1, pp.117-128. Disponible sur <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12150912>

JAIN, R ., et DANZIGER, L H. The Macrolide Antibiotics : A Pharmacokinetic and Pharmacodynamic. ingenta. connect [en ligne]. 2004,10, n°25, p.3045\_3053. Disponibles sur : <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd>.

LANDRY, Yves. (2012) Initiation à la connaissance du médicament – UE6 paces. 2<sup>ième</sup> édition. Dunod. Paris : pp. 41-48.

LE HIR A. (2006). Pharmacie galénique : bonnes pratiques de fabrication des médicaments, 8<sup>ème</sup> édition. Edition : Elsevier Masson .Paris : p.238

MATHIEU S., DEL CERRO C., et NOTIS M-H. (1996). Gérer et assurer la qualité, AFNOR, 6<sup>ième</sup> édition, p.703.

Mc Guire., et *al.* .Ilotycin, a new antibiotic. AntibiotChemother (1952); Vol.2, n°6, pp. 281-3

MOULIN M., et COQUIREL A., (2002). Pharmacologie connaissance et pratique. Edition : Masson. Paris : pp.11 et 37

MERAD. , M et MERAD.,R. (2001). Toxicité des antibiotiques. Médecine du Maghreb 2001, n°91, p. 17.

NEUMAN., Maur. (1979). Vade-Mecum des antibiotiques et agents chimiothérapeutiques anti-infectieux, 4<sup>ème</sup> édition. Édition : Maloine. Paris, p 7-25 et 99-105

NEUMAN., Maur. (1990).Vade-Mecum des antibiotiques et agents chimiothérapeutiques anti-infectieux, 5<sup>ème</sup> édition. Édition : Maloine.Paris :p.21-22-28-29-452-518

ROLAND L., et PATRICE C. (1991). BacterialResistance to Macrolide, Lincosamide, and StreptograminAntibiotics by Target Modification. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY ; Vol.35,n°7,P.1267-1272.

Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1929280#>)

PINNERT-SINDICO S. (1954) Une nouvelle espèce de Streptomyces productrice d'antibiotiques : Streptomycesambofaciensn.sp. Caractères cultureux. Annales de l'Institut Pasteur .Paris, n°87, PP.702-707

YALA D., MERAD A.S., MOHAMEDI D., et OUAR–KORICHI M.N. Médecine du Maghreb (2001), n°91, pp.5-12

Sites internet :

- Pubchem.Open0chemistry0Database.<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6419898#section=LogP>, (consulté le 3/2017)
- <http://www.drugs.com/mnx/spiramycin.html> (consulté le 3/2017)
- <http://www.saidalgroupe.dz>(consulté le 3/2017)

# Annexe A

## Les milieux de cultures

Gélose nutritive (ISO-6579 ISO-10273 ISO-19250) **CONDA 1060.00**

| Composants         | Quantité (g/L) |
|--------------------|----------------|
| peptone            | 5              |
| Extrait de viande  | 1              |
| Extrait de levure  | 2              |
| Chlorure de sodium | 5              |
| Agar               | 15             |

Bouillon lactosé au pourpre de bromochrésol) **CONDA 1272.00**

| Composants         | Quantité (g/L) |
|--------------------|----------------|
| Extrait de viande  | 1              |
| Peptone de caséine | 7              |
| Lactose            | 5              |
| BCP                | 0.03           |

Bouillon Schubert **INSTITU PASTEUR D'ALGERIE**

| Composants           | Quantité (g/L) |
|----------------------|----------------|
| Peptone              | 10             |
| Tryptone             | 10             |
| Acide glutamique     | 0.2            |
| Tryptophane          | 0.2            |
| Sulfate de magnésium | 0.7            |
| Sulfate d'ammonium   | 0.4            |
| Citrate de sodium    | 0.5            |
| Chlorure de sodium   | 2              |
| Mannitol             | 7.5            |

Bouillon Giolitti Cantoni **HIMEDA M584-500G**

| Composants                         | Quantité (g/L) |
|------------------------------------|----------------|
| Hydrolysate enzymatique de caséine | 10             |
| Extrait de viande                  | 5              |
| Extrait de levure                  | 5              |
| Mannitol                           | 20             |
| Chlorure de sodium                 | 5              |
| Chlorure de lithium                | 5              |
| Glycine                            | 1.20           |
| Pyruvate de sodium                 | 3              |

Gélose Violet Rouge Bile glucose (VRBG) **CONDA 1092.00**

| Composition          | Quantité (g/L) |
|----------------------|----------------|
| Glucose monohydraté  | 10             |
| peptone              | 7              |
| Chlorure de sodium   | 5              |
| Extrait de levure    | 3              |
| Sels biliaires       | 1.5            |
| Rouge neutre         | 0.03           |
| Crystal violet       | 0.002          |
| Agar bacteriologique | 15             |

Gélose Salmonella-Shigella **HIMEDIA M108-500G**

| Composition                    | Quantité (g/L) |
|--------------------------------|----------------|
| Peptic digest of animal tissue | 5              |
| Extrait de viande de bœuf      | 5              |
| Lactose                        | 10             |
| Sels biliaires                 | 8.5            |

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Citrate de sodium     | 10      |
| Thiosulfate de sodium | 8.5     |
| Citrate ferrique      | 1       |
| Vert brillant         | 0.00033 |
| Rouge neutre          | 0.025   |
| Agar                  | 15      |

### CHAPMAN **Institut Pasteur d'Alger**

| Composition               | Quantité (g/L) |
|---------------------------|----------------|
| Peptone bacteriologique   | 10             |
| Extrait de viande de bœuf | 3              |
| Chlorure de sodium        | 70             |
| Mannitol                  | 10             |
| Rouge de phénol           | 0,05           |
| Agar-Agar                 | 18             |

### Bouillon sélénite cystéine **institut Pasteur d'Algérie**

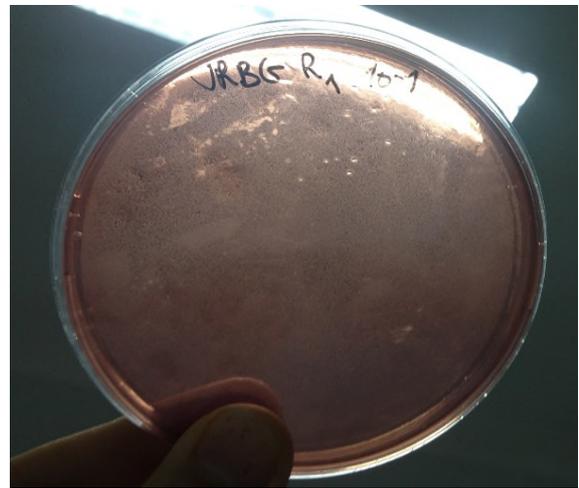
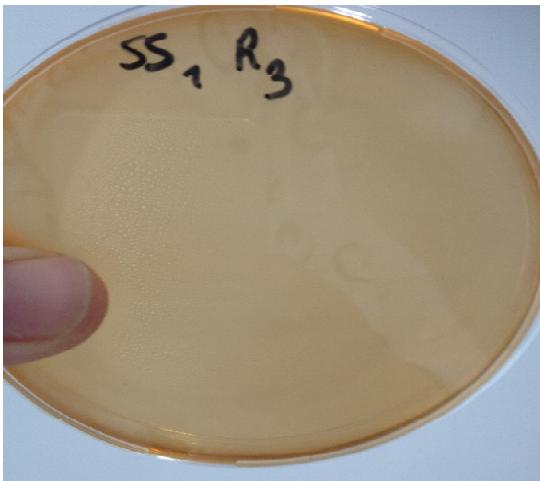
| Composition         | Quantité (g/l) |
|---------------------|----------------|
| Peptone             | 5              |
| Phosphate de sodium | 10             |
| Lactose             | 4              |

### Tryptophane SelEau

| Composition        | Dose  |
|--------------------|-------|
| Tryptophane        | 1 g   |
| Chlorure de sodium | 8.5 g |
| Eau                | 1 L   |

## Annexe B

### Résultats du contrôle de la qualité microbiologique sur Chapman, SS, VRBG et BCPL



## Résumé

Le travail présenté a porté sur le contrôle microbiologique de trois échantillons de même lot du produit fini d'antibiotique « ROVADAL® 0,375 MUI/5 ml » de la famille des macrolides.

L'analyse microbiologique de ce produit relève l'absence de germes pathogènes, la présence non significative de FTAM et levures et moisissures. Enfin, l'efficacité de cet antibiotique est déterminée par la méthode des CMI sur microplaque.

Le médicament, est donc considéré de bonne qualité microbiologique.

**Mots clés :** contrôle microbiologique, Antibiotique, Spiramycine, ROVADAL® 0,375 MUI/5 ml.

## Abstract

The work presented focuses on the microbiological control of three samples of the same batch of finished antibiotic product "ROVADAL® 0.375 MUI / 5 ml" from the macrolide family.

Microbiological analysis of this product indicates the absence of pathogenic germs and the non-significant presence of TMAF, yeasts and molds. Finally, the efficacy of this antibiotic is determined by the method of MIC on microplate.

Therefore, the drug is considered to be of good microbiological quality.

**Keywords:** microbiological control, Antibiotic, Spiramycin, ROVADAL® 0.375 MIU / 5ml.