



**HAL**  
open science

# Défi du dénombrement microbien dans l'industrie pharmaceutique : les nouvelles méthodes alternatives sont-elles appliquées ?

Laura Tordjman-Valency

► **To cite this version:**

Laura Tordjman-Valency. Défi du dénombrement microbien dans l'industrie pharmaceutique : les nouvelles méthodes alternatives sont-elles appliquées ?. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01373145

**HAL Id: dumas-01373145**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01373145>**

Submitted on 28 Sep 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble : [thesebum@ujf-grenoble.fr](mailto:thesebum@ujf-grenoble.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année : 2016

N°

DEFI DU DENOMBREMENT MICROBIEN DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE :  
LES NOUVELLES METHODES ALTERNATIVES SONT-ELLES APPLIQUEES ?

THÈSE

PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE DIPLÔME  
D'ÉTAT

Laura TORDJMAN-VALENCY

*[Données à caractère personnel]*

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le : 13 Septembre 2016

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

M. Le Professeur Aziz BAKRI

Membres :

Directeur de thèse : Mme Le Docteur Lucile PLOURDE-OWOBI

Mme Le Docteur Nawel KHALEF

Mme Le Docteur Catherine PEYRET

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Doyen : SEVE Michel  
Vice-doyenne : DEMEILLIERS Christine

Année 2015-2016

## ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MARTIN	Donald	Laboratoire TIMC-IMAG (UMR 5525 UJF-CNRS)
MOINARD	Christophe	LABFA (U Inserm 1055)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)

### PROFESSEURS EMERITES

CALOP	Jean
GRILLOT	Renée
ROUSSEL	Anne-Marie

Dernière mise à jour : NM 16/02/2016

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 76 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BELAIDI-CORSAT	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique (Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
OUKACINE	Farid	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie (D.P.M)

**MAITRES DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS**

BEDOUCH	Pierrick	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
BUSSER	Benoit	Pharmacie (IAB-INSERM)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I)

**PROFESSEURS CERTIFIES**

FITE	Andrée
GOUBIER	Laurence

**PROFESSEURS ET MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES (PAST/MAST)**

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

**PROFESSEURS AGREGES (PRAG)**

GAUCHARD	Pierre-Alexis	(D.P.M)
----------	---------------	---------

---

CHU : Centre Hospitalier Universitaire  
 CIB : Centre d'Innovation en Biologie  
 DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire  
 HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire  
 IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »  
 IBS : Institut de Biologie Structurale  
 LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes  
 LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée  
 LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux  
 LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie  
 LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine  
 LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques  
 TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition  
 UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Dernière mise à jour : NM 16/02/2016

---

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 76 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

## **Remerciements**

### ***A Monsieur le Professeur Aziz Bakri***

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de présider ce jury de thèse et de juger mon travail. Pour tout ce que vous apportez à vos étudiants et pour tous vos conseils avisés, soyez assuré de mon profond respect.

### ***A Madame le Docteur Lucile Plourde-Owobi***

Pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse, pour votre grande disponibilité et votre investissement dans ce travail, je vous prie de bien vouloir accepter l'expression de toute ma gratitude.

### ***A Madame le Docteur Nawel Khalef***

Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et merci également pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

### ***A Madame le Docteur Catherine Peyret***

Je vous remercie de faire partie de ce jury de thèse et de nous faire profiter de votre expertise. Veuillez trouver ici l'expression de ma respectueuse considération.

Je souhaite également adresser mes sincères remerciements à Monsieur Luc Hermans qui m'a encadré au cours de mon stage de fin d'étude à Sanofi Pasteur. Merci de m'avoir fait participer au projet « ScanRDI® », et de m'avoir suggéré ce sujet de thèse.

### ***A mes parents***

Sans vous, je n'en serais certainement pas là aujourd'hui. Merci pour votre immense soutien, votre confiance et votre accompagnement au cours de ces longues années d'études. Merci pour tout ce que vous m'avez enseigné et l'amour que vous m'avez apporté durant ces 27 dernières années. Les mots me manquent pour vous dire à quel point vous m'êtes chers.

Je vous aime et je vous dédie ce travail.

### *A mon mari, et à mon fils*

Jonathan, merci pour tout ce que tu m'apportes quotidiennement : ta patience, ton écoute attentive et la façon que tu as de me rassurer. J'aime cette vie que nous construisons ensemble ! Merci de m'avoir donné Lior. Mon chéri, cette thèse c'est aussi pour toi que je la présente, afin que tu sois fier de ta maman ! J'ai hâte de découvrir ton sourire, chaque matin...

### *A mon frère Mica*

Tu es notre grand frère qui tient si bien son rôle ! Merci pour tes conseils, merci pour tes perpétuels encouragements ! Tu ne t'imagines pas à quel point ta présence me réconforte. Merci de m'offrir avec Margot cette petite merveille d'Isaac. Je suis tellement heureuse que nos enfants puissent grandir ensemble !

### *A ma sœur Arielle*

Ma petite sœur chérie, je suis si fière de toi ! Tu es unique ! Fragile et forte à la fois, tu m'impressionnes par ta détermination et ta perspicacité... Mais surtout, tu me fais rire ! Tu es le rayon de soleil de la famille.

### *A mes grands parents*

Merci pour votre sagesse, votre bienveillance, et votre amour. Tendrement, merci.

### *Aux familles Tordjman, Assolen, Cardoso, Sobol et Valency*

Vous faites partie de ce cocon familial si important à mes yeux. Je souhaite que tous ces repas de famille, ces fêtes, et ces vacances, puissent durer encore de nombreuses années.

### *A mes amis Grenoblois et Lyonnais*

Nous partageons tant de souvenirs : aux EEIF, en vacances, sur la place Grenette ou Ambroise Courtois ! J'espère que bien d'autres sont encore à venir.

### *A mes amis de la Fac*

Un grand merci à tous mes amis pharmaciens, nous avons passé de belles années pharmas.



## Table des matières

<b>Liste des tables .....</b>	<b>9</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>10</b>
<b>Liste des annexes.....</b>	<b>11</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>12</b>
<b>1 Introduction .....</b>	<b>13</b>
<b>2 Quand suivre la biocontamination ?.....</b>	<b>16</b>
2.1 Les matières premières .....	17
2.2 L'eau .....	17
2.3 Le produit pendant le processus de fabrication.....	21
2.4 Le suivi environnemental.....	21
2.4.1 Contrôle microbiologique de l'air .....	23
2.4.2 Contrôle microbiologique des surfaces .....	25
2.4.3 Contrôle du personnel.....	27
<b>3 Les méthodes de dénombrement de germes recommandées par la Pharmacopée Européenne .....</b>	<b>29</b>
3.1 Les techniques classiques de dénombrement de germes .....	29
3.1.1 Principe des différentes méthodes .....	29
3.1.2 Efficacité des milieux de culture et validité de la méthode de dénombrement .....	34
3.1.3 Solutions et milieux de culture recommandés .....	34
3.1.4 Agents neutralisants.....	35
3.1.5 Recherche de germes spécifiés .....	35
3.2 Spécifications des limites de contamination en fonction de la forme pharmaceutique .....	35
3.3 Plan d'échantillonnage et préparation de l'échantillon.....	38
<b>4 Les nouvelles méthodes microbiologiques.....</b>	<b>41</b>
4.1 Intérêts des méthodes alternatives rapides .....	42
4.1.1 Rapidité d'obtention du résultat .....	43
4.1.2 Diminution des investigations .....	44
4.1.3 Diminution des erreurs humaines .....	44
4.2 La Réglementation .....	45
4.2.1 Chapitre 5.1.6 de la Ph.Eur : « Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique » .....	45

4.2.2	USP <1223> : « Validation of Alternative Microbiological Methods » .....	46
4.2.3	International Conference on Harmonisation (ICH) .....	47
4.2.4	Rapport du PDA n°33: « Evaluation, validation, and implementation of new microbiological testing methods ».....	48
4.3	Implémentation d'une méthode alternative au laboratoire .....	49
4.3.1	Identification des besoins .....	49
4.3.2	Sélection de la nouvelle méthode .....	50
4.3.3	Evaluation de l'impact réglementaire.....	50
4.3.4	Evaluation financière.....	51
4.3.5	Etude de faisabilité .....	51
4.4	Validation d'une méthode alternative.....	52
4.4.1	Analyse de risque.....	52
4.4.2	Qualification de conception.....	53
4.4.3	Qualification d'installation .....	54
4.4.4	Qualification opérationnelle .....	54
4.4.5	Qualification de la performance .....	54
4.4.6	Les critères de performances .....	54
<b>5</b>	<b>Les différentes familles de méthodes alternatives .....</b>	<b>56</b>
5.1	Les méthodes dépendantes de la croissance microbienne .....	56
5.1.1	L'ATP Bioluminescence .....	56
5.1.2	L'impédancemétrie .....	58
5.1.3	La fluorescence.....	58
5.1.4	L'auto-fluorescence .....	60
5.2	Les méthodes indépendantes de la croissance microbienne .....	61
5.2.1	Fluorescence et principe de la cytométrie .....	61
5.2.2	L'auto-fluorescence et PAT.....	66
5.2.3	La spectroscopie Raman .....	67
5.3	Le ScanRDI® : une des principales méthodes alternatives utilisée dans l'industrie pharmaceutique .....	68
5.3.1	Principe de la méthode ScanRDI®.....	69
5.3.2	Applications de la technologie ScanRDI®.....	71
5.3.3	Etudes d'équivalence ou de comparabilité de la méthode ScanRDI® .....	72
<b>6</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>83</b>
	<b>RESUME :.....</b>	<b>922</b>

## Liste des tables

Table I : Comparaison du test de bioburden et du test de stérilité .....	17
Table II : Eau Purifiée en vrac et conditionnée en récipient (Monographie 0008 de la Pharmacopée Européenne).....	18
Table III : Eau Hautement Purifiée (Monographie 1927 de la Pharmacopée Européenne) .....	19
Table IV : Eau pour préparations injectables en vrac et stérilisée (Monographie 0169 de la Pharmacopée Européenne) .....	20
Table V : Nombre maximal de micro-organismes autorisés en ZAC, selon les BPF .....	23
Table VI : Avantages et Inconvénients de la méthode par sédimentation .....	24
Table VII : Avantages/Inconvénients de la méthode par aspiration .....	25
Table VIII : Avantages et inconvénients des différentes méthodes de contrôle microbiologique des surfaces .....	26
Table IX : Avantages/inconvénients de la filtration sur membrane .....	30
Table X : Avantages et Inconvénients de l'ensemencement en profondeur .....	31
Table XI : Avantages et inconvénients de l'étalement en surface .....	32
Table XII: Comparaison des 3 techniques classiques de dénombrement .....	32
Table XIII : Valeur du nombre le plus probable (NPP) de micro-organismes [6] .....	33
Table XIV: Critères d'acceptation de la qualité microbiologique des produits non stériles [7] ....	38
Table XV : Les critères de validation des méthodes microbiologiques .....	55
Table XVI : Comparaison de la méthode standard de la pharmacopée et la méthode ScanRDI®	68
Table XVII : Avantages et inconvénients de la méthode ScanRDI® .....	79

## Liste des figures

Figure 1: Méthode par sédimentation pour réaliser un prélèvement d'air passif .....	24
Figure 2 : Méthode par aspiration pour réaliser un prélèvement d'air actif .....	25
Figure 3 : La luciole, <i>Photinus pyralis</i> .....	56
Figure 4 : La réaction de bioluminescence .....	57
Figure 5 : Le système Milliflex® Rapid .....	57
Figure 6 : Principe de la coloration fluorescente [37] .....	59
Figure 7 : Le système Milliflex® Quantum [37] .....	59
Figure 8: Détection des micro-organismes par le Growth Direct System® [40] .....	60
Figure 9 : Représentation schématique d'un cytomètre en flux [46] .....	63
Figure 10 : Résultats d'analyse par la CMF [47] .....	64
Figure 11 : Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des principaux fluorochromes utilisés en CMF [49] .....	65
Figure 12: Cibles de marquage d'un micro-organisme [51] .....	66
Figure 13 : Le 7000 RMS® [53] .....	67
Figure 14: Seuil de détection des différentes techniques [54] .....	69
Figure 15: Marquage fluorescent de la bactérie [54] .....	70
Figure 16: Principe de la méthode ScanRDI® [54] .....	70
Figure 17: Etapes de l'analyse avec le ScanRDI® .....	71
Figure 18: Résultat de la corrélation pour le système d'eau " nouveau ", sans biofilm [61] .....	75
Figure 19: Résultat de la corrélation pour le système d'eau " vieux ", avec possibilité de formation de biofilm [61] .....	75
Figure 20 : Comparaison des méthodes ScanRDI® et du dénombrement sur boîte de Pétri, sur 20 sites d'échantillonnage différents [62] .....	77

## **Liste des annexes**

Annexe 1 : Définitions des critères de performance .....	89
Annexe 2 : Utilisation du Milliflex® Quantum (Millipore).....	90

## Liste des abréviations

<b>AMDEC</b> : Analyse des Modes de Défaillances, de leurs Effets, et de leur Criticité	<b>NPP</b> : Nombre le Plus Probable
<b>AMM</b> : Autorisation de Mise sur le Marché	<b>OOS</b> : Out Of Specification
<b>ATP</b> : Adénosine Triphosphate	<b>PA</b> : Principe Actif
<b>BPF</b> : Bonnes Pratiques de Fabrication	<b>PAT</b> : Process Analytical Technology
<b>CDC</b> : Cahier Des Charges	<b>Ph.Eur</b> : Pharmacopée Européenne
<b>CMF</b> : Cytométrie en flux	<b>QbD</b> : Quality by Design
<b>Eau PPI</b> : Eau Pour Préparation Injectable	<b>QP</b> : Qualification des performances
<b>EDQM</b> : European Directorate for the Quality of Medicines	<b>QRM</b> : Quality Risk Management
<b>EHP</b> : Eau Hautement Purifiée	<b>SSC</b> : Side Scatter
<b>EP</b> : Eau Purifiée	<b>TR33</b> : Technical Report n°33
<b>FDA</b> : Food Drug Administration	<b>UFC/g</b> : Unité Formant Colonie par gramme
<b>FSC</b> : Forward Scatter	<b>UFC/ml</b> : Unité Formant Colonie par millilitre
<b>ICH</b> : International Conference on Harmonisation	<b>URL</b> : Unité Relative de Lumière
<b>MA</b> : Méthode alternative	<b>ZAC</b> : Zone à Atmosphère Contrôlée
<b>MO</b> : Micro-Organismes	
<b>NAS</b> : Niveau d'Assurance de Stérilité	

# 1 Introduction

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

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

Par la maîtrise de l'environnement et de procédés de production, un produit pharmaceutique peut avoir une charge microbienne très faible, voire nulle comme exigé pour les formes injectables. Il est accepté pour certains produits, comme les formes sèches, la présence d'une microflore d'origine multiple. Néanmoins, il est essentiel d'avoir un maximum d'informations sur la **biocharge**. En effet, les micro-organismes présents dans les préparations non stériles peuvent réduire voire annuler l'activité thérapeutique du produit. Et certains connus pour leur pathogénicité chez l'homme ne sont pas tolérés et leur détection entraîne la destruction du produit.

Les fabricants de produits pharmaceutiques sont donc tenus de maîtriser les procédés afin d'assurer une faible biocharge dans les formes finies, en appliquant les **bonnes pratiques de fabrication** (BPF) et en respectant les **exigences microbiologiques** spécifiées par les Pharmacopées. Les opérations de fabrication et de contrôle exigent également la mise en œuvre et le suivi de procédures et de méthodes soigneusement mises au point et validées.

En termes de référence pour l'industrie, la Pharmacopée Européenne (Ph.Eur) différencie les contrôles microbiologiques en trois grandes catégories :

- **Les essais qualitatifs** - ils servent à déterminer si des micro-organismes (MO) viables sont présents ou absents dans le produit. Les techniques utilisées reposent sur la détection des changements liés au développement et à leur croissance. L'essai de stérilité est le meilleur exemple pour illustrer un essai qualitatif avec l'observation d'un trouble dans le milieu de culture en cas d'un développement microbien qui a pour origine la présence d'un contaminant dans le produit testé.
- **Les essais quantitatifs de dénombrement** - les trois techniques les plus couramment utilisées sont la méthode de filtration sur membrane, la méthode de dénombrement sur plaque et la méthode du nombre le plus probable. Cette dernière est généralement

appliquée en dernier recours, lorsque la nature de l'échantillon ne permet pas de réaliser un dénombrement direct sur plaque (solide non soluble, corps gras...).

Le principe de filtration est préféré car il permet d'éliminer l'activité antimicrobienne résiduelle du produit. De plus, cette méthode est très sensible (1 colonie dénombrée).

- **Les essais d'identification** - Dans certains cas, il est demandé de rechercher, en parallèle à la flore mésophile, des germes spécifiés, soit témoins d'un niveau de contamination soit dont la présence est indésirable. Par exemple, dans « les critères d'acceptation de la qualité microbiologique des formes pharmaceutiques non stériles » Chapitre 5.1.4 de la Pharmacopée Européenne, il est spécifié la nature des MO dont la présence n'est pas tolérée selon la forme pharmaceutique du produit.

L'identification biochimique et morphologique d'un micro-organisme inconnu est la méthode classique dans les essais de la pharmacopée. D'autres méthodes sont également mises en place : les méthodes moléculaires d'identification (ARN 16S) ou protéomique par spectrométrie de masse.

Dans l'exercice de cette thèse, nous allons nous intéresser uniquement aux essais quantitatifs de dénombrement microbien, appelés également « **Bioburden** ». Ce test consiste au dénombrement de germes dans un produit, exprimés dans l'échantillon.

Les techniques classiques, décrites par la Pharmacopée Européenne, sont le plus souvent utilisées. Ces techniques de référence basées sur le principe de culture sont connues depuis de nombreuses années, elles sont donc bien maîtrisées et faciles à mettre en œuvre d'un point de vue réglementaire. En revanche, elles impliquent une phase de croissance dont les conditions de culture représentent les principales limites du test : température, durée, composition du milieu sont-ils toujours adaptés à la microflore qui doit être retrouvée ? La contamination microbienne obtenue ne peut être connue avant un délai de 5 jours en moyenne (14 jours pour un essai de stérilité). De plus, ces méthodes sont consommatrices de temps et de personnel car elles nécessitent de nombreuses étapes manuelles, difficiles à automatiser.

Pour répondre aux besoins des laboratoires d'analyse, des fabricants spécialisés dans la commercialisation de milieux de culture, ont développé et mis sur le marché des méthodes



commerciales adaptées aux impératifs d'une production industrielle, à savoir plus simples, plus rapides et/ou plus économiques que les méthodes classiques dites de référence: les « rapid microbial methods » RMM ou « modern microbial methods » MMM, dites aussi alternatives.

Dans un premier temps, nous verrons quand les industries pharmaceutiques sont amenées à suivre la biocontamination, puis nous détaillerons les techniques de référence utilisées.

Après avoir défini et expliqué l'intérêt des nouvelles méthodes de détection dites alternatives, nous présenterons le contexte réglementaire auxquelles elles sont confrontées. Nous tenterons ensuite de répondre à ces deux questions :

1. Comment les industriels doivent-ils choisir la méthode alternative à utiliser ?
2. Comment la valider et la mettre en place en routine au laboratoire ?

Puis, nous aborderons les différentes familles de méthodes alternatives disponibles et illustrerons par quelques exemples. Enfin, nous terminerons par l'étude d'un cas : l'implémentation de l'équipement ScanRDI® dans l'industrie pharmaceutique, utilisé pour l'analyse microbienne de l'eau.

## 2 Quand suivre la biocontamination ?

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

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

**L'environnement de production** (air, eau et surfaces) est également contrôlé régulièrement selon le niveau d'exigence de production, il existe 4 classes d'air dont la plus propre est dédiée aux produits stériles (classe A). Dans cet environnement, les opérateurs sont également soumis à une stricte réglementation.

Les réglementations imposent que certains produits, comme les médicaments injectables, soient stériles lors de leur commercialisation. Cette garantie de stérilité est apportée par des tests sur les matières premières, les produits en cours de fabrication, l'environnement de production et les produits finis. La rigueur de ces contrôles est un gage de qualité : elle garantit la sécurité du consommateur.

Il est donc important de différencier le **test bioburden** de l'**essai de stérilité** (Table I). En effet, le test de bioburden s'applique à un produit qui n'est pas stérile, alors que l'essai de stérilité est effectué après une étape de stérilisation sur un produit que l'on attend stérile, comme le vaccin. Différentes techniques de stérilisation peuvent être utilisées : stérilisation par la chaleur sèche ou humide (autoclavage), filtration stérilisante à l'aide d'un filtre de 0,22 µm, ou par rayonnements électromagnétiques (béta, gamma).

Un médicament dit « stérile » doit répondre à trois critères :

1. l'absence de particules
2. l'apyrogénicité
3. l'absence de micro-organismes viables ou revivifiable.

**Table I : Comparaison du test de bioburden et du test de stérilité**

<b>Test de bioburden</b>	<b>Test de stérilité</b>
Produit non stérile	Produit attendu stérile
Test quantitatif (en UFC/ml ou g)	Test qualitatif (produit stérile ou non)
Un milieu de culture utilisé à une température	Deux milieux de cultures utilisés à deux températures
Période d'incubation : 5 jours minimum	Période d'incubation : 14 jours
Test effectué sous poste de sécurité microbiologique	Test effectué sous isolateur

Les tests de dénombrements de germes interviennent donc à des nombreux niveaux lors de la production d'un médicament et plus précisément, sur les matières premières, l'eau, le produit durant le procédé de fabrication et l'environnement de production. Le terme "unité formant colonie" (UFC) est utilisé quand on veut déterminer le nombre de cellules viables donnant chacune naissance, dans l'échantillon, à une colonie.

## **2.1 Les matières premières**

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

## **2.2 L'eau**

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

chacune des eaux « monographiées », les méthodes d'analyse pour accepter leur conformité et leur(s) mode(s) de génération [1].

- Eau purifiée (EP) (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**II), destinée à la préparation de médicaments autres que ceux qui doivent être stériles et exempts de pyrogènes, sauf exception justifiée et autorisée. Sont distinguées l' « eau purifiée en vrac » et l' « eau purifiée conditionnée en récipient ».

**Table II : Eau Purifiée en vrac et conditionnée en récipient  
(Monographie 0008 de la Pharmacopée Européenne)**

Essai	EP en vrac	EP conditionnée en récipient
Carbone organique total	< 0,5 mg/l	< 0,5 mg/l
Acidité ou alcalinité	Non	Oui
Conductivité (à 20° C)	4,3 µS/cm	1,1 µS/cm
Substance oxydables	Oui	Oui
Nitrates : < 0,2 ppm	Oui	Oui
Sulfates	Non	Oui
Aluminium : < 10 ppb	Oui	Oui
Ammonium : < 0,2 ppm	Oui	Oui
Calcium et Magnésium	Non	Oui
Métaux lourds : < 0,1 ppm	Oui	Oui
Contamination particulaire	Non	Non
Stérilité	Non	Non
Endotoxines bactériennes	< 0,25 UI/ml	
Germes aérobies viables totaux	100 UFC/ml	10 UFC/ml

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

**Table III : Eau Hautement Purifiée (Monographie 1927 de la Pharmacopée Européenne)**

<b>Essai</b>	<b>EHP</b>
Carbone organique total	< 0,5 mg/l
Acidité ou alcalinité	Non
Conductivité (à 20 °C)	1,1 µS/cm
Substance oxydables	Non
Nitrates : < 0,2 ppm	Oui
Sulfates	Non
Aluminium : < 10 ppb	Oui
Ammonium : < 0,2 ppm	Oui
Calcium et Magnésium	Non
Métaux lourds : < 0,1 ppm	Oui
Contamination particulaire	Non
Stérilité	Non
Endotoxines bactériennes	< 0,25 UI/ml
Germe aérobie viables totaux	10 UFC/100 ml

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

**Table IV : Eau pour préparations injectables en vrac et stérilisée (Monographie 0169 de la Pharmacopée Européenne)**

Essai	EPPI en vrac	EPPI stérilisée
Carbone organique total	< 0,5 mg/l	< 0,5 mg/l
Acidité ou alcalinité	Non	Oui
Conductivité (à 20 °C)	1,1 µS/cm	25 µS/cm (< 10 ml) 5 µS/cm (> 10 ml)
Substances oxydables	Non	Oui
Nitrates : < 0,2 ppm	Oui	Oui
Sulfates	Non	Oui
Aluminium : < 10 ppb	Oui	Oui
Ammonium : < 0,2 ppm	Oui	Oui
Calcium et Magnésium	Non	Oui
Métaux lourds : < 0,1 ppm	Oui	Oui
Contamination particulaire	Non	Non
Stérilité	Non	Oui
Endotoxines bactériennes	< 0,25 UI/ml	< 0,25 UI/ml
Germes aérobies viables totaux	10 UFC/100 ml	Stérile

- Eau utilisée durant les cycles de nettoyage et de rinçage : L'eau intervient également dans la stérilisation des équipements et la sanitisation des systèmes (stérilisation à la vapeur ou sanitisation à l'eau surchauffée). Elle entre donc en contact direct ou indirect avec le produit qui sera administré au patient et c'est à ce titre que le législateur a imposé un cadre réglementaire. D'une part, les bonnes pratiques de fabrication (BPF) exposent les préceptes à appliquer dans l'exploitation, la maintenance et le suivi des systèmes d'eaux à usage pharmaceutique et impose la soumission de ces systèmes au processus de qualification.

### **2.3 Le produit pendant le processus de fabrication**

La Pharmacopée fixe des spécifications microbiologiques sur le produit fini selon sa forme pharmaceutique (se référer au chapitre 3). Les industriels réalisent des tests microbiologiques tout au long de processus de fabrication sur le produit afin de maîtriser au mieux la biocontamination et d'obtenir un résultat acceptable sur le produit fini. Pour cela, le procédé de fabrication est étudié en détail, les étapes dites « critiques » sont sélectionnés afin de réaliser des analyses microbiologiques sur le produit intermédiaire. Des spécifications en interne sont alors établies : la contamination résiduelle obtenue sur le produit intermédiaire doit être inférieure à la limite préalablement fixée.

Cette démarche est particulièrement importante sur les procédés biologiques. Prenons l'exemple du vaccin, c'est un produit stérile, nous devons donc avoir aucune contamination sur le produit final. Cependant, il est indispensable de maîtriser la biocontamination tout au long de la production, et ainsi de réaliser des tests aux étapes de culture, de purification ou encore de répartition. En effet, la présence de MO dans les préparations stériles peut engendrer différents problèmes. D'une part si des MO pathogènes sont présents, ils peuvent transmettre leur pouvoir infectieux au patient. D'autre part, certains MO peuvent relarguer des endotoxines qui sont responsables de l'effet pyrogène. Ces derniers sont surtout des bactéries à Gram négative, car elles disposent d'une membrane externe riche en lipopolysaccharides. Le lipopolysaccharide contient un lipide, appelé lipide A, qui peut se retrouver dans l'environnement au cours de la lyse bactérienne et potentiellement peut être transporté jusque dans le produit à repartir. Chez l'homme, le lipide A va être phagocyté par les macrophages ce qui va induire une réaction immunitaire de type inflammatoire, dont l'effet pyrogène est un des effets [2].

### **2.4 Le suivi environnemental**

En fonction du type de produit (solide, liquide, pâteux ou injectable), le type de procédé et de traitement d'air ne sera pas le même. La réglementation est claire grâce aux recommandations des BPF définissant 4 classes d'empoussièrement à atteindre suivant deux états d'occupation (au repos et en activité) pour 2 tailles de particules (0,5 µm et 5 µm). C'est ce qu'on appelle les zones à atmosphère contrôlées (ZAC). Pour chaque classe, un taux maximal de biocontamination est défini (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.V**).

- Classe A : C'est la classe la plus contraignante, où l'environnement de production doit être le plus stérile possible. Les postes de travail sous flux d'air laminaire satisfont normalement aux conditions requises pour ce type d'opérations. Afin de garantir le maintien de cette classe, des points de prélèvements sont réalisés afin de suivre la conformité réglementaire. Sont identifiés les points où sont réalisées les opérations à haut risque, tels que le point de remplissage, les emplacements des bols vibrants de bouchons, les ampoules et les flacons ouverts ou les points de raccordements aseptiques.
- Classe B : Elle est utilisée dans le cas d'opérations aseptiques de préparation et de remplissage. La classe B est l'environnement immédiat d'une zone de travail de classe A.
- Classes C et D : Ce sont des zones à atmosphère contrôlée destinées aux étapes moins critiques de la fabrication des médicaments stériles.

Des situations intermédiaires peuvent être retrouvées : une zone de classe A peut-être située dans des locaux de classe C. Par exemple, un isolateur dans une pièce d'un laboratoire analytique.

Un programme de suivi environnemental couvrant tous les postes de production incluant l'air, les sols, les murs, et les surfaces des équipements doit être mis en place. Ce suivi doit obligatoirement inclure les points critiques qui entrent en contact direct avec les produits, le contenant ou le système de fermeture de ce contenant [3]. Le suivi environnemental doit être « procéduré », c'est-à-dire que des procédures doivent être rédigées et respectées. Ce suivi est ainsi défini en termes de durée, fréquence et localisation (points de prélèvement). Il concerne les particules et les MO potentiellement présents dans les ZAC [4]. Nous traiterons ici, uniquement la surveillance microbiologique. Elle est effectuée sur les points les plus à risques et permet de prouver que les conditions d'asepsie ont été maintenues tout au long de la production [5].



**Table V : Nombre maximal de micro-organismes autorisés en ZAC, selon les BPF**

Limites recommandées de contamination microbiologique (a)				
Classe	Echantillon d'air UFC/m <sup>3</sup>	Boîtes de Pétri (diamètre 90 mm), UFC/4 heures (b)	Géloses de contact (diamètre 55 mm), UFC/plaque	Empreintes de gant (5 doigts) UFC /gant
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Notes :

(a) Il s'agit de valeurs moyennes.

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

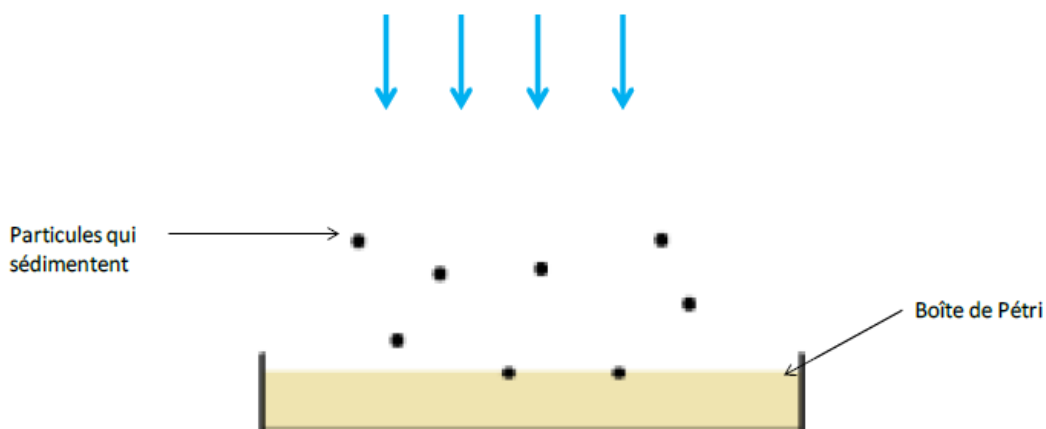
A noter, qu'en classe C et D, les empreintes des gants ne sont pas obligatoires car le port des gants n'est pas une obligation réglementaire.

Les BPF nous imposent un contrôle de l'air par prélèvement actif et par sédimentation, un contrôle de surface par gélose de contact et enfin un contrôle par empreintes des gants des opérateurs travaillant en ZAC [3].

#### **2.4.1 Contrôle microbiologique de l'air**

▪ Méthode par sédimentation : prélèvement passif de l'air :

Une boîte de Pétri contenant un milieu gélosé est laissée ouverte pendant une durée prédéterminée afin de recueillir les particules par sédimentation (Figure 1 et table VI).



**Figure 1 : Méthode par sédimentation pour réaliser un prélèvement d'air passif**

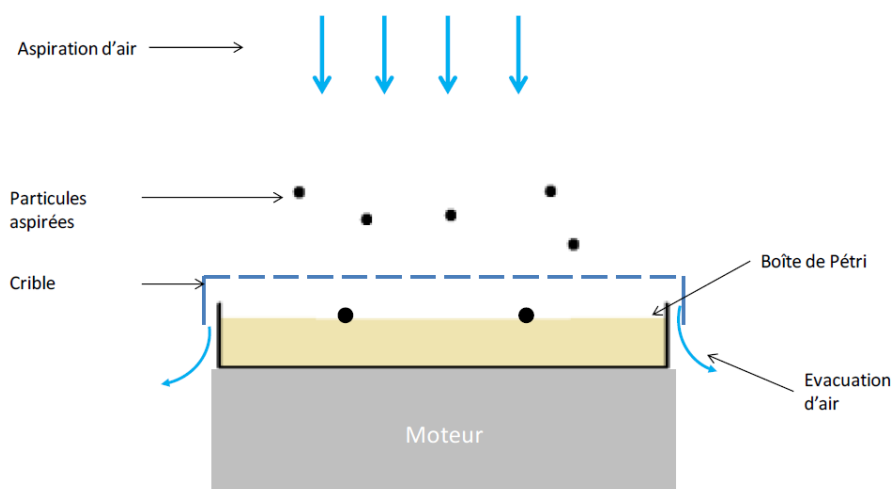
Cette méthode simple à mettre en œuvre présente l'inconvénient majeur de la durée de prélèvement (Table VI).

**Table VI : Avantages et Inconvénients de la méthode par sédimentation**

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

- Méthode par aspiration : prélèvement actif de l'air

Des biocollecteurs d'air microbien sont utilisés afin de réaliser le prélèvement. Un certain volume d'air est aspiré au travers d'un crible qui permet de faire s'impacter les MO et particules sur une boîte de Pétri contenant un milieu gélosé (Figure 2). Le volume aspiré doit être représentatif de la zone considérée. Le débit de l'air doit être suffisant pour pouvoir prélever 1 m<sup>3</sup> d'air dans un temps raisonnable et afin d'obtenir une vitesse d'impaction appropriée, et d'assurer l'impaction des particules tout en assurant la conservation de la viabilité des particules, (Table VII).



**Figure 2 : Méthode par aspiration pour réaliser un prélèvement d'air actif**

Cette méthode qui nécessite l'usage d'un équipement présente également l'inconvénient majeur de la durée de prélèvement (Table VII).

**Table VII : Avantages/Inconvénients de la méthode par aspiration**

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

#### 2.4.2 Contrôle microbiologique des surfaces

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

- **Méthodes par empreinte :**

Boîte contact : il s'agit d'une boîte de Pétri possédant un ménisque de milieu de culture convexe. La boîte est fixée à un appareil permettant une application facilitée sur la surface à contrôler : l'applicateur de boîte contact. Il permet d'appliquer une pression définie et un temps de contact défini. Cet appareil dispose d'une alarme émettant un son indiquant la fin du

prélèvement lorsque le temps et la force d'application ont été respectés. On applique directement ce milieu de culture sur la surface à prélever.

Lame gélosée, recouverte de chaque côté par un milieu de culture. On applique directement le milieu de culture sur la surface à contrôler.

Pétrifilm : il s'agit d'un milieu gélosé déshydraté placé entre deux films. On l'applique directement sur la surface à contrôler après réhydratation.

▪ **Méthode par écouvillonnage :**

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

▪ **Méthode par chiffonnettes ou épongettes :**

La méthodologie est identique à l'écouvillonnage. Après prélèvement, les milieux de culture sont mis à incuber à température adéquate.

Plusieurs approches sont donc mises en œuvre pour réaliser le contrôle des surfaces, caractérisées par certaines limites (Table VIII). Elles sont complémentaires ou spécifiques et donc adaptées selon le besoin (Table VIII).

**Table VIII : Avantages et inconvénients des différentes méthodes de contrôle microbiologique des surfaces**

	<b>Boîte contact</b>	<b>Lame gélosée</b>	<b>Ecouvillonnage</b>
Prêt à l'emploi	Oui	Oui	Non
Facile d'utilisation	Oui	Oui	Non
Méthode standardisée	Oui	Non	Non
Milieu sélectif possible	Oui	Oui	Oui
Action mécanique possible	Non	Non	Oui
Utilisation sur des surfaces non planes possible	Non	Non	Oui

### 2.4.3 Contrôle du personnel

Le personnel est un vecteur potentiel important de contamination croisée. Tous les membres du personnel doivent être conscients des principes des bonnes pratiques de fabrication qui les concernent. Les BPF leur consacrent même un chapitre entier : le chapitre 2, [3].

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

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

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

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

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

De plus, chaque personne travaillant dans les locaux de production suit, en préalable à tout travail autonome, des formations qui la certifient à exercer les tâches qui lui sont confiées. Le personnel doit être correctement formé et qualifié pour réaliser toute opération qui est spécifique à son poste de travail. L'entreprise sera particulièrement vigilante pour les opérations manuelles, par exemple

le conditionnement de produits semi-finis. Cette formation et cette qualification initiale sont ensuite relayées par une formation continue et une revalidation périodique qui assure le respect des bonnes pratiques de production.

### **3 Les méthodes de dénombrement de germes recommandées par la Pharmacopée Européenne**

#### **3.1 Les techniques classiques de dénombrement de germes**

La Pharmacopée Européenne décrit plusieurs techniques de référence pour le dénombrement de germes : la filtration sur membrane, le dénombrement sur plaque et la méthode du nombre le plus probable. Le choix de la méthode doit se faire en fonction de la nature du produit et de la limite microbienne spécifiée. Pour chaque analyse, il faut s'assurer que la méthode choisie est adaptée et que la prise d'essai sur l'échantillon est suffisante pour permettre l'évaluation de la conformité aux spécifications.

##### **3.1.1 Principe des différentes méthodes**

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

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

C'est la méthode recommandée en première intention par la pharmacopée.

Le principe est de concentrer les microorganismes potentiellement présents dans un produit filtrable sur une membrane qui sera mise en contact avec un milieu nutritif approprié permettant ainsi la croissance microbienne en colonie visible à l'œil nu.

- Le produit liquide est filtré sur une membrane de porosité de 0,45 µm. Une attention toute particulière doit être apportée au matériau constituant la membrane. En effet, le produit à examiner ou l'un de ses constituants ne doit pas modifier l'efficacité de la rétention bactérienne.
- La membrane est ensuite rincée avec un diluant, avant d'être mise en contact avec un milieu nutritif approprié au développement des bactéries.
- La boîte de milieu gélosé est incubée à 30-35°C pendant 5 jours (minimum).

- Le nombre d'UFC est ensuite compté à la surface de chaque boîte. Le résultat s'exprime en UFC/ml ou UFC/g.

Cette méthode s'applique particulièrement bien pour le contrôle d'un produit en cours de fabrication (test de bioburden) et pour la recherche de biocontamination initiale (avant filtration stérilisante), par exemple. En résumé, elle se caractérise par des forces et des faiblesses rapportées dans la table IX.

**Table IX : Avantages/inconvénients de la filtration sur membrane**

<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
Permet d'éliminer l'activité antimicrobienne résiduelle du produit	Ne peut être utilisé que pour des produits filtrables
Possibilité de filtrer tout l'échantillon	Altération invisible possible de la membrane par des produits corrosifs
Méthode sensible (1 colonie dénombrée)	Concentration maximale dénombrée : $\approx 100$ UFC
Possibilité de dénombrer sur d'autres membranes des produits corrosifs (alcools, acides...)	

### ➤ **Méthode de dénombrement sur plaque**

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

- Dénombrement par ensemencement en profondeur

Cette méthode est appropriée pour les produits non filtrables ou non solubles.

L'échantillon, de 1 ml pur ou dilué est déposé dans une boîte de Petri vide puis mélangé à un milieu gélosé liquéfié adapté à la culture des bactéries. Deux boîtes de Petri par milieu et par dilution doivent être préparées. Les boîtes sont incubées 5 jours à 30-35 °C. Le dénombrement s'effectue sur les boîtes présentant le plus grand nombre de colonies inférieur à 300. La moyenne arithmétique des dénombrements permet le calcul du nombre d'unités formant colonie par gramme ou par millilitre.



Cette méthode s'applique particulièrement bien pour le contrôle de matières premières. En résumé, elle se caractérise par des forces et des faiblesses rapportées dans la Table X.

**Table X : Avantages et Inconvénients de l'ensemencement en profondeur**

<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
Produits testés visqueux, opaques	Méthode longue (préparation importante)
Quantité testée : 1 ml pur ou dilué de 10 en 10	Elimination minimale de l'activité antimicrobienne résiduelle par dilution du produit dans la gélose
Sensibilité = 300 UFC/ boîte	
Possibilité d'utiliser tous les milieux à régénérer disponibles dans le commerce	
Possibilité d'incubation en atmosphère spécifique (CO <sub>2</sub> , anaérobie)	

- Dénombrement par étalement en surface

L'échantillon de 100 µl est étalé à la surface de boîtes de Pétri à milieux gélosés appropriés à la culture des bactéries. Tout comme dans le cas de l'ensemencement en profondeur, deux boîtes de Pétri par milieu et par dilution sont préparées. De même, les conditions d'incubation et les calculs sont effectués comme précédemment. Cette méthode permet également de dénombrer des germes dans des produits non filtrables. En résumé, elle se caractérise par des forces et des faiblesses rapportées dans la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.I.**

**Table XI : Avantages et inconvénients de l'étalement en surface**

<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
Volume testé = 100 µl	Ne peut être utilisé pour les produits visqueux, épais
Sensibilité (entre 10 UFC/ml et 1000 UFC/ml)	L'activité antimicrobienne résiduelle du produit est conservée
Possibilité d'utiliser tous les milieux pré-coulés disponibles dans le commerce	Pas très précis pour les prélèvements peu contaminés
Possibilité d'incubation en atmosphère spécifique (CO <sub>2</sub> , anaérobie)	

Finalement, selon la quantité d'échantillon à tester et la sensibilité attendue, il est alors possible de privilégier une méthode à une autre (Table XII).

**Table XII: Comparaison des 3 techniques classiques de dénombrement**

<b>Filtration sur membrane</b>	<b>Ensemencement en profondeur</b>	<b>Etalement en surface</b>
1 ml < quantité testée > 100 ml	Quantité testée : 1 g ou 1 ml de dilution de 10 en 10	Quantité : 100 ml
0 < sensibilité > 100 UFC /vol filtré	0 < sensibilité > 100 UFC/boîte	10 UFC/ml < sensibilité > 3000 UFC/ml

### ➤ **Méthode du nombre le plus probable**

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

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

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

Le résultat sera donné par lecture dans la Table XIII.

**Table XIII : Valeur du nombre le plus probable (NPP) de micro-organismes [6]**

Combinaisons observées du nombre de tubes présentant une croissance dans chaque série			NPP par gramme ou millilitre de produit	Limites de confiance à 95 pour cent
Nombre de grammes ou millilitres de produit par tube				
0,1	0,01	0,001		
0	0	0	< 3	0-9,4
0	0	1	3	0,1-9,5
0	1	0	3	0,1-10
0	1	1	6,1	1,2-17
0	2	0	6,2	1,2-17
0	3	0	9,4	3,5-35
1	0	0	3,6	0,2-17
1	0	1	7,2	1,2-17
1	0	2	11	4-35
1	1	0	7,4	1,3-20
1	1	1	11	4-35
1	2	0	11	4-35
1	2	1	15	5-38
1	3	0	16	5-38
2	0	0	9,2	1,5-35
2	0	1	14	4-35
2	0	2	20	5-38
2	1	0	15	4-38
2	1	1	20	5-38
2	1	2	27	9-94
2	2	0	21	5-40
2	2	1	28	9-94
2	2	2	35	9-94
2	3	0	29	9-94
2	3	1	36	9-94
3	0	0	23	5-94
3	0	1	38	9-104
3	0	2	64	16-181
3	1	0	43	9-181
3	1	1	75	17-199
3	1	2	120	30-360
3	1	3	160	30-380
3	2	0	93	18-360
3	2	1	150	30-380
3	2	2	210	30-400
3	2	3	290	90-990
3	3	0	240	40-990
3	3	1	460	90-1980
3	3	2	1100	200-4000
3	3	3	> 1100	

### **3.1.2 Efficacité des milieux de culture et validité de la méthode de dénombrement**

L'efficacité des milieux de culture doit être démontrée. Sur chaque lot de milieu, qu'il soit acheté prêt à l'emploi ou préparé, des contrôles doivent être effectués. Pour cela, des souches de référence sont utilisées pour préparer des suspensions « témoin » contenant jusqu'à 100 UFC par ml. Des suspensions utilisant des MO de référence de nature différentes (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) sont mise en œuvre conformément à la Pharmacopée pour les méthodes de dénombrement décrites en présence et en absence du produit à analyser. D'autres souches représentatives de l'environnement sont également testées, elles sont spécifiques de chaque laboratoire. Ces isolats « sauvage » permettent de challenger la fertilité des milieux à tester.

Pour les milieux solides, le nombre de colonies obtenues ne doit pas différer de plus d'un facteur deux de la valeur calculée à partir de la solution témoin pour chaque MO de référence ou à celle obtenue sur un lot de milieu précédemment contrôlé et approuvé.

Pour les milieux liquides, la croissance des MO doit être clairement visible et comparable à celle obtenue sur un lot de milieu précédemment contrôlé et approuvé.

La validité de la méthode doit également être prouvée. Elle dépend de la stérilité du milieu, du diluant, et de l'efficacité des conditions d'asepsie. Un contrôle sur un témoin négatif est requis (utilisation d'une solution tampon peptonée au chlorure de sodium au pH 7, par exemple). Aucune croissance microbienne ne doit être observée. Dans le cas contraire, une investigation doit être menée.

### **3.1.3 Solutions et milieux de culture recommandés**

La composition des solutions et des milieux de culture est parfois donnée à titre d'information ou de recommandation. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de montrer que leurs propriétés nutritives et sélectives sont satisfaisantes pour l'essai concerné. Cependant le choix est primordial dans la mesure où l'on peut, dans certains cas, aboutir à des résultats sensiblement différents. C'est pour cette raison que la réglementation de la Pharmacopée Européenne a été harmonisée avec celle des pharmacopées américaine et japonaise afin d'obtenir une cohérence mondiale dans les méthodes de test microbiologiques pour les produits non stériles [7]. Grâce à ce travail d'harmonisation, de nombreux milieux de culture sont conformes aux nouvelles réglementations

décrites dans les méthodes compendiales. Par exemple, la base Baird Parker pour la détection de *Staphylococcus aureus* a été remplacée par une gélose mannitol-sel et le bouillon « Rappaport Vassiliadis » pour la détection de *Salmonella* a été introduit dans les textes réglementaires [8].

### **3.1.4 Agents neutralisants**

Nous avons vu qu'il peut parfois être nécessaire de neutraliser un possible pouvoir antimicrobien généré par le produit à tester, en additionnant le diluant d'agents neutralisants. Ainsi, par exemple, le jaune d'œuf est utilisé pour neutraliser les composés à fonction ammonium quaternaire, le thiosulfate de sodium pour neutraliser les composés halogénés.

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

### **3.1.5 Recherche de germes spécifiés**

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

Lors de cette recherche, il est nécessaire de revivifier les MO dans la mesure où l'utilisation de milieux sélectifs employés n'autorise pas la mise en évidence de MO ayant subi des lésions sub-létales. Par exemple, la Ph.Eur exige de vérifier l'absence de *E.Coli* dans les formes orales, et l'absence d'*S.aureus* et *P.aeruginosa* dans les formes transdermiques et vaginales (cf. table XIV).

Les milieux utilisés pour l'étape de revivification ou de culture, tout comme les températures d'incubation préconisées sont primordiales dans cette recherche [9].

## **3.2 Spécifications des limites de contamination en fonction de la forme pharmaceutique**

La fabrication de médicaments stériles ou non stériles impose des exigences particulières en vue de réduire les risques de contamination microbienne et particulaire. Le « contrôle qualité » joue dans ce domaine un rôle primordial.

La qualité microbiologique du médicament doit être vérifiée. Le dénombrement des bactéries, des moisissures et des levures capables de croître en aérobiose permet de vérifier la qualité microbiologique des produits finis, vrac ou des matières premières.

Les résultats de ces tests doivent être conformes aux exigences fixées par la pharmacopée, afin que le médicament puisse être libéré. En effet, la présence de germes dans le produit peut diminuer son activité et peut présenter un risque important pour la santé du patient. Les industries pharmaceutiques sont donc tenues de s'assurer que la biocharge au sein du médicament soit faible, en respectant les BPF tout au long du processus de fabrication, de la conservation, et de la distribution du produit.

Au niveau du produit fini, la pharmacopée fixe des limites de contamination en fonction de la forme pharmaceutique du médicament, afin d'assurer le maximum de sécurité pour le patient. La forme pharmaceutique est liée à la stabilité du PA, et à la voie d'administration du produit. Ces deux paramètres vont permettre d'expliquer que les critères d'acceptation de la qualité microbiologique soient différents selon la forme pharmaceutique.

#### ➤ **La voie d'administration**

Les médicaments disponibles sur le marché peuvent être administrés au patient par des voies variées :

- Par voie orale : les comprimés, les gélules, les sirops, les ampoules buvables.
- Par voie cutanée : les pommades, les crèmes, les lotions.
- Par voie ophtalmique : les pommades, les collyres.
- Par voir ORL : les collutoires, bains de bouches, pommade nasale.
- Par voie respiratoire : les inhalateurs, les aérosols.
- Par voie vaginale : les comprimés gynécologiques, les ovules.
- Par voie transdermique : les patchs.
- Par voie rectale : les suppositoires, les pommades, les lavements.
- Par voie injectable : en sous cutané, en intramusculaire, en intraveineuse.

Plus la voie d'administration est invasive, plus les conséquences en cas de contamination du produit peuvent être dramatiques pour le patient. Par exemple, un produit administré par voie intraveineuse accède directement à la circulation sanguine du patient. Le risque infectieux est très

élevé, la présence d'un microorganisme au sein du produit pourrait conduire à provoquer une septicémie. Les exigences en termes de biocharge autorisée sont donc très strictes.

C'est pour cela que tous les médicaments administrés par voie injectable doivent être stériles. Les BPF définissent la stérilité comme l'absence d'entité capable de survivre et de se multiplier. L'état de stérilité absolue, c'est-à-dire un nombre de germes égale à zéro, n'est théoriquement pas réalisable. La Pharmacopée Européenne propose le Niveau d'Assurance de Stérilité (NAS). Le NAS est atteint quand une seule unité non rigoureusement stérile pourrait être présente sur une population de un million.

Il est important de préciser que les autorités de santé fixent des critères d'acceptation de la qualité microbiologique uniquement pour les formes pharmaceutiques finies, en vue de la libération des produits (Table XIV). Cependant, les industries pharmaceutiques ont la responsabilité de maîtriser, tout au long du processus de fabrication, la qualité microbiologique de leurs produits. Afin de garantir ces exigences, des spécifications internes de l'entreprise sont fixées. Des tests de dénombrement de germes sont régulièrement réalisés sur les matières premières, sur le produit vrac, sur le produit réparti ... Ces spécifications appliquées à des stades intermédiaires sont déterminées en fonction de la performance des équipements (susceptibilité à éliminer une charge microbienne, par une étape de filtration par exemple). Elles peuvent également être définies selon les recommandations des fournisseurs (cas des matières premières).

### ➤ **La stabilité**

La ligne directrice de l'ICH « Essais de stabilité de nouveaux produits et substances médicamenteux » définit la stabilité comme *« l'aptitude d'un médicament à conserver ses propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans des limites spécifiées pendant toute sa durée de validité »*.

Certaines formes pharmaceutiques sont connues pour être moins stables que d'autres. Par exemple, les préparations aqueuses sont moins stables que les non-aqueuses. C'est ce qui explique que la Ph. Eur fasse une distinction entre les préparations administrées par voie orale aqueuses et non aqueuses. Les critères d'acceptation de la qualité microbiologique sont plus stricts pour les formes pharmaceutiques aqueuses (Table XIV).

**Table XIV: Critères d'acceptation de la qualité microbiologique des produits non stériles [7]**

Voie d'administration	DGAT (UFC/g ou UFC/mL)	DMLT (UFC/g ou UFC/mL)	Microorganismes spécifiés
Voie orale : préparations non aqueuses	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	Absence d' <i>Escherichia coli</i> (1 g ou 1 mL)
Voie orale : préparations aqueuses	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence d' <i>Escherichia coli</i> (1 g ou 1 mL)
Voie rectale	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	.
Voie buccale Voie gingivale Voie cutanée Voie nasale Voie auriculaire	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g ou 1 mL) Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g ou 1 mL)
Voie vaginale	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g ou 1 mL) Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g ou 1 mL) Absence de <i>Candida albicans</i> (1 g ou 1 mL)
Voie transdermique (limites pour un dispositif transdermique, film protecteur et support compris)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1 dispositif) Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 dispositif)
Inhalation (des exigences spécifiques s'appliquent aux préparations liquides dispensées au moyen de nébuliseurs)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g ou 1 mL) Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g ou 1 mL) Absence de bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires (1 g ou 1 mL)
♦Disposition spéciale de la Ph. Eur. pour les préparations pour administration par voie orale contenant des matières premières d'origine naturelle (animale, végétale ou minérale), lorsqu'un prétraitement antimicrobien est impossible et que l'Autorité compétente admet une DGAT des matières premières supérieure à 10 <sup>3</sup> UFC/g ou UFC/mL.	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	Au maximum 10 <sup>2</sup> UFC de bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires (1 g ou 1 mL) Absence de salmonelles (10 g ou 10 mL) Absence d' <i>Escherichia coli</i> (1 g ou 1 mL) Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g ou 1 mL)♦

### 3.3 Plan d'échantillonnage et préparation de l'échantillon

Les tests de dénombrement de germes doivent être réalisés dans des conditions permettant d'éviter toute contamination microbienne extrinsèque du produit à examiner. Les prélèvements doivent être effectués par du personnel formé aux techniques de prélèvements afin d'éliminer tout risque de contamination accidentelle du produit. La durée maximale entre le prélèvement et la réalisation du test doit être défini en tenant compte des différentes étapes de la production et du temps de stockage. C'est ce que l'on appelle le « Holding Time ».

Le plan d'échantillonnage dépend de nombreux paramètres tel que les caractéristiques du produit, la taille du lot, le niveau de contamination présumé du produit, l'homogénéité de distribution des MO.



La méthode de préparation des échantillons est choisie selon les caractéristiques physiques du produit. La Ph. Eur dans le chapitre 2.6.12 « Contrôle microbiologique des produits non stériles : essais de dénombrement microbien » [6], décrit plusieurs méthodes en différenciant les produits hydrosolubles, les produits de nature non lipidique insolubles dans l'eau, les produits de nature lipidique, les produits liquides ou solides sous forme d'aérosols, et les dispositifs transdermiques.

- Pour les produits hydrosolubles :

En général, une solution est préparée en diluant la quantité prélevée dans un diluant (solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH7.0 par exemple ou tout autre diluant approprié). Le rapport de dilution le plus fréquent est de 1/10 mais il peut être adapté aux caractéristiques du produit ou à une sensibilité requise différente.

- Pour les produits de nature non lipidique insolubles dans l'eau :

La préparation est identique à la précédente hormis le fait qu'un agent tensio-actif peut être ajouté au diluant pour une meilleure mise en suspension. Le tensio-actif le plus couramment utilisé est le Polysorbate 80.

- Pour les produits de nature lipidique :

La présence d'un agent tensioactif est ici nécessaire. Il est ajouté en quantité égale à la moitié de la masse du produit à examiner maximum, et mélangé en chauffant si nécessaire à une température maximum de 40 °C. Le mélange obtenu est ensuite amené à dilution au 1/10 avec le diluant déjà décrit à la même température.

- Pour les produits liquides ou solides sous forme d'aérosols :

Dans des conditions stériles, le produit doit être transféré dans une membrane filtrante ou dans un récipient stérile. Pour réaliser l'échantillon, la totalité du produit ou un nombre déterminé de doses peut être utilisé.

- Pour les dispositifs transdermiques :

Après retrait du film protecteur, les dispositifs transdermiques sont placés, face adhésive vers le haut sur des plateaux de verre ou des plateaux stériles. La face adhésive du dispositif transdermique est ensuite recouverte d'une matière poreuse stérile comme une

gaze stérile. Les dispositifs sont alors transférés dans un diluant comme le polysorbate 80 et maintenu sous agitation pendant minimum 30 minutes.

Certains produits possèdent naturellement un pouvoir antimicrobien. Un agent neutralisant peut être ajouté afin d'annuler cette activité comme le jaune d'œuf utilisé pour neutraliser les composés à fonction ammonium quaternaire. Il est alors indispensable, de prouver l'efficacité et l'absence de toxicité de l'agent neutralisant utilisé. De la même façon, si la préparation de l'échantillon nécessite l'ajout d'un tensioactif, il faudra prouver son efficacité et son absence de toxicité.

La taille de l'échantillon doit être représentative et suffisante pour permettre l'évaluation de la conformité aux spécifications. La taille de l'échantillon est variable selon le produit à examiner et doit tenir compte du produit, et du niveau de contamination présumé. En règle générale, le « contrôle qualité » doit être fait sur 10 g ou 10 ml du produit à examiner, en 10 exemplaires. Dans le cas où la quantité d'échantillon ou la taille de lot est limitée, comme pour les essais cliniques, la prise d'essai devra représenter 1 pourcent du lot. Enfin, les échantillons doivent être prélevés au hasard dans le produit.

En conclusion, les techniques de contrôle microbiologique, standardisées par les Pharmacopées, sont bien connues des industriels. Elles sont simples d'utilisations, peu coûteuses et faciles à mettre en œuvre. Cependant, les méthodes traditionnelles pour détecter ou compter les MO nécessitent la croissance des MO, ce qui présente deux inconvénients majeurs : le temps d'attente avant d'obtenir un résultat et la faculté du MO à se multiplier sur le milieu de culture utilisé. Afin d'améliorer principalement ces deux critères, des nouvelles méthodes analytiques ont été développées ces trente dernières : les méthodes alternatives (MA). Elles sont particulièrement intéressantes pour les industries pharmaceutiques.

## 4 Les nouvelles méthodes microbiologiques

La modernisation des méthodes analytiques apporte des améliorations importantes en termes de rapidité, de précision et de spécificité, par rapport aux méthodes de référence décrites précédemment (cf. § 3).

Les industries alimentaires et cosmétiques ont déjà pu bénéficier de ces méthodes alternatives. Certaines de ces techniques semblent pouvoir être adaptées au domaine pharmaceutique, soit pour des protocoles de la Pharmacopée européenne (contamination initiale, analyse microbienne des eaux ...) soit pour des contrôles « in process » permettant le cas échéant de prendre des mesures correctives à temps.

Sont attendus des méthodes modernes en microbiologie, principalement un délai de résultat plus court et si possible une détermination directe du MO et une simplification de la méthodologie.

Deux grands groupes de méthodes peuvent être individualisées :

1. Les méthodes directes permettant de détecter le MO en tant que cellule individuelle vivante.
2. Les méthodes nécessitant la croissance microbienne mais avec un moyen de détection plus rapide que le trouble microbien ou la formation de colonie visible à l'œil nu.

Il existe de nombreuses recommandations concernant l'utilisation et la validation de ces MA. Comme le PDA Technical Report #33 [10], les chapitres 5.1.6 de la Ph.Eur. [11] et <1223> de l'USP [12] ou l'ICH Q2(R1) [13]. Ces publications décrivent un ensemble de nouvelles méthodes microbiologiques, exposent le principe et présentent les utilisations potentielles dans l'industrie pharmaceutique. Elles fournissent également des instructions pour prouver l'équivalence de la nouvelle méthode avec la méthode de référence, et ainsi procéder à la validation de la méthode choisie.

L'objectif de ces validations est de démontrer que la méthode permet de détecter les MO potentiellement présents dans le produit analysé de façon reproductible et au moins aussi bien que la méthode traditionnelle. Avec une validation appropriée et surtout si les méthodes traditionnelles sont difficilement applicables, les méthodes alternatives sont acceptées du point de vue réglementaire.

Comme pour toute nouvelle méthode, une qualification des performances (QP) de la méthode est nécessaire que l'on peut définir en différentes phases QP1, vérification de la performance attendue de la méthode avec des MO test standards et sans produit, QP2, Performance de la méthode appliquée aux produits avec comparaison avec la méthode traditionnelle (cf. § 4.4).

Cependant, il n'existe pas de recommandation spécifique à chaque MA, car chaque test analytique repose sur un principe physico-chimique différent, ce qui peut freiner les industriels à mettre en place la nouvelle méthode au laboratoire.

De plus, il n'y a malheureusement pas à l'heure actuelle une méthode alternative aux méthodes traditionnelles qui soit applicable à toutes les analyses microbiologiques et à tous les produits. Un cahier des charges suffisamment précis doit permettre le choix entre toutes les méthodes disponibles.

#### **4.1 Intérêts des méthodes alternatives rapides**

La plupart des laboratoires d'analyses de microbiologie utilise les méthodes traditionnelles de culture connues depuis plus de 100 ans. Ces tests sont peu coûteux, mais nécessite la croissance des MO afin qu'ils soient détectés par l'œil humain. Les délais d'obtention des résultats sont longs : minimum 5 jours pour un test de dénombrement de germes. Durant cette attente de résultats, la production peut être arrêtée ou, face aux besoins de productivité de l'industrie, des lots sont engagés à risque. C'est-à-dire que des lots potentiellement contaminés continuent leur processus de fabrication. Aujourd'hui de nouvelles méthodes microbiologiques sont disponibles et permettent de répondre au besoin de réactivité des entreprises.

L'AFNOR définit dans la norme ISO 16140 une méthode alternative comme *«une méthode d'analyse qui permet de déterminer ou d'estimer pour une catégorie de produits donnée, le même analyte que celui mesuré avec la méthode de référence correspondante. Elle se caractérise par des propriétés adaptées aux besoins de l'utilisateur... »* [14].

La Ph.Eur décrit les méthodes alternatives, dans le chapitre 5.1.6, comme *« des méthodes de contrôle de la qualité microbiologique, dont certaines ce sont avérées capable de livrer des résultats en temps réel (ou quasi réel), ouvrant la possibilité d'une action corrective plus*

*précoce. Ces nouvelles méthodes apportent également une amélioration significative de la qualité des contrôles* ». [11].

Une méthode alternative est donc une méthode commerciale permettant de détecter ou de dénombrer les mêmes MO que ceux mesurés par une méthode normalisée et qui présente en plus un des avantages comme la rapidité d'analyse, la facilité d'exécution ou d'automatisation...

Les industries sont également très soucieuses de réduire les erreurs humaines, ce qui est un autre avantage potentiellement attendu de ces méthodes modernes. L'implémentation des MA permet ainsi d'avoir une qualité accrue du produit et une meilleure maîtrise du processus de fabrication [15].

#### **4.1.1 Rapidité d'obtention du résultat**

En plus d'une grande précision, l'automatisation de la détection permet d'obtenir des résultats beaucoup plus rapidement que le comptage manuel de la culture traditionnelle. Pour les méthodes classiques, les colonies doivent atteindre une taille importante pour être détectée par l'œil humain. Il est parfois nécessaire d'attendre 14 jours pour obtenir des données utilisables (cas de l'essai de stérilité pour les bactéries à croissance lente). Les MA ont besoin d'un nombre plus restreint de cellules pour donner un résultat, elles sont beaucoup plus sensibles. Si bien que certaines méthodes permettent d'obtenir un résultat seulement en quelques heures, et l'analyse peut même être réalisée sur le lieu de production. Les dispositions à prendre en cas de contamination peuvent être ainsi quasi immédiates.

L'énumération automatisée des germes et le transfert informatique des données permettent également un gain de temps considérable. En effet, avec les méthodes traditionnelles, chaque « comptage » doit être inscrit sur un support papier ou enregistré sur un logiciel qui gère les bases de données; alors que les résultats obtenus par l'imagerie numérique sont instantanément enregistrés et compilés.

De plus, l'automatisation de la méthode a l'avantage de traiter des centaines d'échantillons en même temps. Ce gain de temps permet au personnel du « contrôle qualité » de se concentrer sur les échantillons positifs. L'obtention rapide de résultats conduit à diminuer le nombre d'enquêtes, diminuer les temps d'arrêt de production et diminuer ainsi le nombre de lots perdus [16].

#### **4.1.2 Diminution des investigations**

La réduction des OOS est une préoccupation majeure pour les industries pharmaceutiques. Chaque OOS, conduit dans un premier temps le laboratoire à réaliser une enquête afin de confirmer le résultat, puis si le résultat est confirmé, la production doit elle aussi mener une investigation afin d'identifier la cause racine et mettre le plus rapidement possible des actions correctives en place.

En fonction du contexte et de leur complexité, chaque OOS peut coûter de 5000 euros à 20000 Euros en main d'œuvre et matériaux. De plus, les enquêtes peuvent retarder la libération du produit. Celles-ci doivent être réalisées avec la plus grande précision, et tous les moyens nécessaires doivent être déployés. En effet, les autorités de santé portent le plus grand intérêt aux enquêtes pendant les inspections.

L'automatisation des MA empêche les erreurs humaines de comptage manuel ou d'erreurs de saisie de données évitant ainsi des excursions inutiles. De cette façon, le personnel peut se concentrer plus rapidement en cas d'OOS. L'investigation et l'identification de la cause racine est plus rapide. La résolution du problème est plus efficace. L'automatisation permet également d'éviter les contaminations croisées, lors d'un transfert si le test est réalisé en zone de production. Enfin, le dénombrement automatique permet de réaliser des analyses de tendance beaucoup plus facilement. Le personnel du « contrôle qualité » peut identifier rapidement les variations.

#### **4.1.3 Diminution des erreurs humaines**

Des erreurs humaines peuvent survenir en production lors du prélèvement de l'échantillon ou au laboratoire lors de la réalisation de l'analyse. Il s'agit de contaminations croisées. Celles-ci mènent parfois à un résultat OOS. Les coûts associés aux erreurs humaines sont difficiles à quantifier mais sont bien connus des industries de production.

Les méthodes traditionnelles, très manuelles sont particulièrement sujettes aux erreurs humaines. Elles nécessitent la réalisation de tâches très répétitives. Pendant l'incubation, les géloses peuvent être égarées ou jetées par mégarde avant analyse. Les échantillons peuvent également être détériorés lors du transfert entre le lieu de prélèvement et le lieu d'analyse. Le comptage manuel, effectué à l'œil nu, est opérateur dépendant. La retranscription des données peut également être la source d'erreurs.

Certaines MA réalisent une détection, une énumération, et un transfert automatique des données, ce qui permet de réduire le risque d'erreur [17]. Le comptage précis dû à l'automatisation évite la variabilité des résultats souvent obtenue lors d'un comptage manuel par les techniciens de laboratoire.

L'utilisation des MA augmente la productivité. L'automatisation évite aux opérateurs de réaliser des tâches redondantes. Plusieurs centaines d'échantillons peuvent être traités en même temps. La détection rapide et précise des germes permet une meilleure réactivité en cas de contamination et donc une résolution du problème plus efficace. Ceci est possible par la transmission en temps réel des résultats enregistrés par les équipements. La charge de travail pour le personnel du laboratoire est significativement diminuée. Un appareil d'analyse dite « rapide » utilisée en production permet non seulement l'obtention du résultat quasi immédiatement mais également de supprimer les trajets « production-laboratoire d'analyse », qui sont conséquents sur les grands sites de production.

## **4.2 La Réglementation**

### **4.2.1 Chapitre 5.1.6 de la Ph.Eur : « Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique »**

Face à l'émergence des méthodes alternatives, la Ph. Eur a publié un chapitre en 2006 afin de faciliter la mise en œuvre et l'emploi des MA [11].

La Ph.Eur classe les MA en trois grands groupes :

1. Les méthodes fondées sur la croissance des MO : ces méthodes nécessitent une phase de croissance microbienne permettant ainsi l'obtention d'un signal détectable. Comme la turbidimétrie, la calorimétrie ou la bioluminescence.
2. Les méthodes directes, avec différenciation et visualisation de cellules individuelles, par exemple la cytométrie en phase solide ou en flux.
3. Les méthodes reposant sur l'analyse de composants cellulaires, avec mesure indirecte d'une présence microbienne grâce à l'expression d'un composant cellulaire spécifique. Nous retrouvons dans cette catégorie les méthodes immunologiques comme le test ELISA, ou encore la Spectrométrie de masse.

En première intention, la Ph.Eur recommande aux industriels de choisir une MA reposant sur la croissance microbienne. En effet, cette catégorie de méthode se rapproche le plus des méthodes traditionnelles de référence. Ce chapitre apporte également une aide pour procéder à la validation de la méthode choisie. Il précise les critères de validation requis : exactitude, spécificité, limite de détection, robustesse... En 2009, L'EDQM a initié une révision de ce chapitre. Une première version « draft » a été publiée en 2015. La version 2 de ce chapitre n'est toujours pas disponible.

#### **4.2.2 USP <1223> : « Validation of Alternative Microbiological Methods »**

Un chapitre similaire existe dans la pharmacopée américaine : Chapitre <1223> « Validation of Alternative Microbiological Methods » [12] et [18]. Il a été publié pour la première fois en 2006, et révisé en 2015. La nouvelle version est plus flexible, afin que toutes les méthodes alternatives disponibles soient utilisables et que l'application du Process Analytical Technology (PAT) soit facilitée. En effet, la Food Drug Administration (FDA) considère le PAT comme un outil pour la conception, l'analyse, et le contrôle microbiologique grâce à des tests en temps réel et à des moments critiques lors de la fabrication ou sur les matières premières. Cette démarche permet d'assurer une qualité accrue du produit final [19].

La FDA encourage aussi fortement le Quality by Design (QbD) pour les étapes critiques du processus de fabrication. L'identification, et la surveillance de ces étapes garantissent une qualité constante tout au long de la chaîne de fabrication [17]. A la fois logique et complexe, le QbD se définit comme une approche systématique du développement d'un médicament, qui vise à mieux explorer les caractéristiques des molécules, à mieux connaître le procédé de fabrication en l'explorant aux limites et en identifiant les paramètres critiques. Avec l'introduction du QbD théorisé dans l'ICH Q8 [20] et [21], le développement pharmaceutique évolue vers une meilleure connaissance des interactions entre produit et procédé de fabrication avec à la clé une plus grande flexibilité accordée par les autorités réglementaires.

La FDA a également publié « des protocoles de comparabilité » afin de faciliter l'utilisation des MA et du PAT [22]. L'utilisation de ces recommandations permet de réduire les risques que la soumission du dossier des variations aux autorités de santé soit rejetée, et donc que l'application de la méthode alternative soit retardée. De plus, le laboratoire de la FDA réalise et publie des tests de comparaison entre les méthodes traditionnelles et les MA. Pour ne citer qu'une étude, des tests



avec le vaccin contre la grippe ont été effectués entre la méthode de référence et trois solutions disponibles (Rapid Milliflex®, BacT/Alert® et BACTEC®)[23].

En 2015, l'USP a constitué un « Modern Microbiological Methods (MMM) Expert Panel » qui travaille spécifiquement sur le test de stérilité rapide. Leur objectif est de définir des recommandations basées sur les exigences relatives à un test officiel moderne / rapide pour la préparation stérile spécifique (traitement de maladie grave) et des produits de thérapie cellulaire. Le groupe d'experts devra commencer avec une page blanche et établir les besoins des utilisateurs en termes de temps aux résultats, LOD, la précision, la spécificité, la taille de l'échantillon, le coût et la facilité d'utilisation dans un laboratoire de tests de routine. Une fois que les besoins établis, le groupe sélectionnera les technologies les plus appropriés en tant que « candidats » à un test de stérilité rapide.

#### **4.2.3 International Conference on Harmonisation (ICH)**

L'ICH créée en 1990, s'est donnée comme mission de réaliser des recommandations pour l'industrie pharmaceutique publiées sous forme de guides, dans le but d'harmoniser les pratiques. Il fait coopérer au niveau international des acteurs appartenant aux autorités et des acteurs appartenant à l'industrie pharmaceutique. L'harmonisation des trois principales pharmacopées (européenne, japonaise et américaine) entraîne la nécessité d'élaborer des normes internationales de qualité.

En 2006 les trois pharmacopées ont donc harmonisé les chapitres relatifs aux contrôles des produits non stériles. A partir de janvier 2009, les procédures analytiques d'examen des produits non stériles sont interchangeables entre les régions de la Conférence Internationale d'Harmonisation. Les industries pharmaceutiques peuvent comparer des résultats issus de divers sites en se référant à une méthode unique.

Ils peuvent également mettre en place des méthodes d'analyse harmonisées dans le monde entier pour éviter une redondance des travaux et réduire ainsi les délais nécessaires à la mise au point de médicaments innovants.

Certains changements concernent les conditions expérimentales utilisées pour la recherche des micro-organismes. Par exemple certains nouveaux milieux ont été introduits dans ces textes, comme le milieu « Rappaport Vassiliadis » pour la recherche des *Salmonella*. Toutefois, le

changement le plus important concerne les modifications de qualification des performances des milieux de culture.

Enfin, les textes harmonisés autorisent l'utilisation de méthodes de remplacement en microbiologie (systèmes automatisés par exemple).

#### **4.2.4 Rapport du PDA n°33: « Evaluation, validation, and implementation of new microbiological testing methods »**

La Parenteral Drug Association est une association internationale à but non lucratif regroupant 10 000 membres, scientifiques ou non, travaillant dans les domaines du développement, de la fabrication, du contrôle de la qualité et de la réglementation des produits pharmaceutiques et parapharmaceutiques. La mission de l'association consiste à soutenir le progrès des techniques pharmaceutiques. La PDA propose un programme mondial de conférences, de réunions et de forums de discussion permettant aux fabricants des produits pharmaceutiques, aux fournisseurs, aux représentants des milieux académiques et aux responsables de la réglementation de se rencontrer et de discuter de questions présentant un intérêt commun. La PDA assure également la publication de nombreuses ressources techniques pour les scientifiques et les professionnels de la réglementation dans le PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology (<http://journal.pda.org/>).

Le Technical Report n°33 (TR33) apporte une aide pour l'évaluation, la validation et la mise en œuvre de méthodes microbiologiques alternatives [10].

Bien que les méthodes classiques de culture microbiologique présentent de nombreuses limites, les méthodes alternatives dites rapides commencent seulement ces dernières années à être mises en place dans l'industrie pharmaceutique, alors que celles-ci sont utilisées de façon plus courante dans l'industrie agroalimentaire ou cosmétique. Ce retard est dû, en partie, à un manque d'orientation claire concernant la démonstration de l'équivalence de la méthode alternative choisie par rapport à la méthode de référence, afin que celle-ci soit autorisée par les autorités de Santé, et également à la rigidité des dossiers réglementaires dans lesquels sont précisés les tests [24]. En effet, la mise en place d'une MA nécessite de gérer des variations réglementaires.

Le PDA Technical Report N° 33 a été publié pour la première fois en 2000, il a ensuite été révisé en 2013 [10]. C'est le premier rapport apportant une aide à la validation des MA. Les

pharmacopées européennes et américaines ont publiées leurs propres chapitres peu après, en 2006 (cf, § 4.2.1 et § 4.2.2). Le chapitre <1223> de l'USP [12] et le chapitre 5.1.6 de la Ph.Eur [11] fournissent ainsi des conseils afin de valider une méthode alternative microbiologique.

Cependant, une approche plus compréhensible est nécessaire afin que la qualification et la mise en place de la nouvelle méthode soit facilitée par les industriels et qu'elle soit acceptée d'un point de vue réglementaire. Le TR33 est donc destiné à fournir une approche globale pour la mise en application de méthodes microbiologiques alternatives, dans un environnement réglementé par les autorités de santé [25].

En fournissant des standards de qualification, de développement et de performance, la mise en œuvre de méthodes alternatives rapides sera accélérée.

### **4.3 Implémentation d'une méthode alternative au laboratoire**

Lorsqu'une entreprise envisage de remplacer une méthode classique microbiologique par une méthode alternative, il est important de réaliser une évaluation à la fois scientifique, et économique avant d'investir dans la nouvelle méthode. Une stratégie solide d'implémentation doit être mise en place, afin d'anticiper l'ensemble des impacts en lien avec le changement (qualité, organisation du travail, bénéfices attendus, autres coûts associés...).

#### **4.3.1 Identification des besoins**

Tout d'abord, il faut identifier les intérêts potentiels (qualité, rapidité, coûts...), les avantages techniques que le laboratoire peut espérer obtenir en modifiant le test utilisé en routine par une méthode alternative.

Il est nécessaire de savoir pourquoi on souhaite changer de méthode d'analyse : Pour obtenir des résultats plus rapidement ? Pour automatiser la technique ? Pour avoir un résultat plus précis ? Pour réaliser des économies ?

Pour cela, il est nécessaire d'avoir une connaissance approfondie de la méthode à remplacer : il s'agit d'un test qualitatif, quantitatif, ou de stérilité ? Quel est le niveau de contamination des produits à analyser ? Réalise-t-on une identification des MO ?

### **4.3.2 Sélection de la nouvelle méthode**

Ensuite, il faut identifier les nouvelles technologies disponibles, capables de remplacer la méthode de référence. Les candidats potentiels doivent répondre aux besoins scientifiques et économiques déterminés par l'entreprise.

Il est important de comprendre les capacités techniques de la nouvelle méthode : le niveau de détection, la spécificité (pour quel type de MO), le débit, le type d'échantillon (filtrable ou non), l'automatisation de la machine, la capacité et la durée d'analyse... Il est également indispensable d'estimer la durée de formation des opérateurs à prévoir.

Les autorités américaines imposent que le système utilisé réponde à la réglementation 21 CFR part 11. Cette loi permet d'utiliser de la manière la plus exhaustive possible la technologie électronique, elle sécurise l'enregistrement et la signature électronique. La certification 21 CFR part 11 de la méthode alternative est un critère prérequis par l'entreprise pharmaceutique lors de son choix [26].

Il est également indispensable d'orienter le choix de la MA en fonction du fournisseur qui la commercialise. La sélection du fournisseur de la MA est toute aussi importante que la MA elle-même. Une étude et une compréhension approfondie des capacités techniques sont primordiales (renommée, entreprise référencée, capacité à intervenir rapidement, santé financière, perspective de croissance...).

Il faut envisager l'aide qu'il pourra apporter lors des différentes étapes de la validation ainsi que le service après-vente, l'assistance qu'il assurera une fois l'appareil mis en place. La notoriété du fournisseur, si l'appareil est déjà utilisé en routine dans d'autres entreprises, est également à prendre en compte.

En fonction de l'importance qu'octroie le laboratoire à chacun des critères, et en utilisant par exemple un système de cotation, une sélection de 1 ou 2 candidats potentiels est réalisée. Les méthodes alternatives choisies peuvent ensuite être présentées à l'entreprise dans le cadre d'un investissement stratégique.

### **4.3.3 Evaluation de l'impact réglementaire**

Le changement de la méthode traditionnelle par la MA implique une révision du dossier réglementaire. La modification de la technique doit être autorisée par les autorités de santé. La

charge de travail et le délai d'obtention de la variation du dossier d'AMM doivent être pris en compte lors de l'implémentation de la technique, ainsi que le plan de convergence réalisé par le management du changement sur tous les produits impactés [27].

#### **4.3.4 Evaluation financière**

Une évaluation financière, comparant les frais engendrés par la méthode classique et la MA alternative doit être réalisé afin de convaincre l'entreprise d'investir dans ce changement.

- Les coûts de la méthode classique : renseigner le nombre et le prix de tests par an, le temps de l'analyse et le coût de la main d'œuvre associé, le coût de l'équipement et de son entretien. On peut également inclure la perte financière due aux problèmes de contamination, nettoyage, formation de biofilms rencontrés. Les coûts totaux sur 5 ans sont ensuite estimés.
- Les coûts de la méthode alternative : l'investissement pour le nouvel équipement, le nombre de tests par an possible, le prix par test, le temps pour chaque test, le prix du à la validation et à la soumission réglementaire, le coût de la formation des opérateurs à la nouvelle méthode. Les coûts sur 5 ans sont ensuite estimés.
- Les économies suite à l'implémentation de la MA doivent aussi être évalué, sur une durée de 5 ans : temps de travail en moins pour les opérateurs, réduction du nombre de tests, diminution des frais de transports, réduction des coûts suite à un cycle du produit plus court, meilleure réactivité en cas d'OOS ...

Grâce à ces estimations, et à la présentation de tous les avantages scientifiques, le retour sur investissement peut être calculé, permettant ainsi d'envisager ou non l'implémentation de la nouvelle méthode au laboratoire.

#### **4.3.5 Etude de faisabilité**

Une étude de faisabilité peut également être effectuée, pour déterminer si le produit à analyser est compatible avec la méthode d'analyse choisie. Ce type d'étude peut s'avérer particulièrement nécessaire dans le cas où le fournisseur a peu ou pas de données disponibles sur le produit à analyser. Cette étude peut être directement menée par le client grâce à un appareil disponible *via* un contrat de location. Si l'étude est réalisée par le fournisseur, l'entreprise envoie, dans ce cas, des échantillons du produit à analyser. Les données obtenues lors de cette première étude aideront

à prendre la décision d'acheter ou non la nouvelle méthode analytique et serviront, par la suite, pour mieux définir le protocole de la validation.

En résumé, l'implémentation d'une méthode alternative doit comprendre une étude scientifique, réglementaire et financière solide. La MA alternative choisie doit présenter des avantages scientifiques par rapport à la méthode de référence, doit être appropriée au produit à analyser et applicable en routine au laboratoire. En effet, il arrive parfois qu'une industrie ait consacré beaucoup de temps, de ressources, et d'argent pour implémenter et valider une nouvelle méthode, et réalise une fois le nouvelle méthode achetée que celle-ci est incompatible avec le produit, le processus ou que la sensibilité, la spécificité obtenue n'est pas celle désirée. Par conséquent, il est important d'établir un planning détaillé, programmant chaque phase du projet afin de réussir l'implémentation et la validation de la nouvelle méthode.

L'implémentation d'une MA est un processus complexe, qui nécessite du temps et un investissement financier. De plus, les entreprises sont confrontées à un contexte réglementaire compliqué, les lignes directrices aujourd'hui disponibles sont encore insuffisantes. Toutes ces raisons, peuvent dissuader l'entreprise de changer de méthode d'analyse.

#### **4.4 Validation d'une méthode alternative**

La validation est définie par les bonnes pratiques de fabrication (BPF) comme : *« l'établissement de la preuve, en conformité avec les principes des BPF, que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matières premières, article de conditionnement ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés »*.

De même, la FDA définit la validation, comme *« la preuve documentée avec un haut degré d'assurance qu'un procédé spécifique produira régulièrement les résultats escomptés en terme de qualité et de spécifications »*.

L'application de la MA doit comprendre la qualification de l'équipement et la validation de la méthode d'analyse, à proprement dites.

##### **4.4.1 Analyse de risque**

Une évaluation des risques doit être effectuée avant le début de toute activité de validation. En effet, la ligne directrice Q9 de l'ICH [28], définit le Quality Risk Management (QRM) comme un

processus systématique durant le cycle de vie d'un médicament, afin de garantir la qualité du produit. Les risques identifiés varient en fonction de la technologie, du fournisseur, de la variabilité de la méthode choisie, ou encore du risque réglementaire. Plusieurs outils de gestion de la qualité et d'analyse de risques peuvent être utilisés, l'ICH Q9 propose une description de certains des outils employés par l'industrie et par les autorités compétentes pour gérer le risque qualité (AMDEC, HACCP...) [28].

L'Analyse des modes de défaillances, de leurs effets, et de leur criticité (AMDEC) permet une évaluation des modes de défaillance des procédés et de leur effet probable. C'est une démarche logique et de bon sens, admettant qu'aucun système n'est infaillible. Cette méthode intègre une enquête sur le degré de gravité des conséquences, leurs fréquences d'apparition et leur détectabilité. L'objectif de l'AMDEC est d'identifier les domaines où des mesures préventives supplémentaires peuvent être appropriées pour minimiser les risques.

En anglais, l'acronyme HACCP signifie *Hazard Analysis and Critical Control Point*. Initialement développée dans les années soixante pour l'industrie chimique aux Etats-Unis, la méthode HACCP fut rapidement reprise par les industries agroalimentaires. Aujourd'hui, cet outil de gestion des risques est utilisé à l'international afin de garantir la qualité, la fiabilité et la sécurité d'un produit. Le principe de la méthode est de se focaliser sur la prévention plutôt que sur des actions correctives.

Une évaluation du matériel informatique et des logiciels nécessaires à l'utilisation de la nouvelle méthode doit être réalisé. Leur conformité au 21 CFR doit également être vérifiée. Un audit du fournisseur est aussi à prévoir.

#### **4.4.2 Qualification de conception**

Elle doit être fournie par le fabricant, elle apporte la preuve documentée que la conception de l'équipement est compatible avec l'application correcte de la méthode.

Les exigences du futur utilisateur peuvent être documentées dans un cahier des charges (CDC). Le CDC sera ensuite utilisé comme guide pour les tests de validation à venir [29].

#### **4.4.3 Qualification d'installation**

Il s'agit ici de valider la conformité du matériel livré, en accord avec le descriptif fournisseur. Il faut également, référencer et enregistrer la documentation liée à la validation de la méthode alternative. La qualification d'installation peut être réalisée avec le fournisseur.

#### **4.4.4 Qualification opérationnelle**

Cela consiste à valider la fonctionnalité du système dans les conditions d'utilisation, et de vérifier que la réalisation d'une action sur différents éléments permet bien d'obtenir la réponse attendue [30]. Le matériel informatique, ainsi que les logiciels peuvent être qualifiés, si besoin. Le fournisseur peut apporter son aide pour cette étape, si l'entreprise le désire.

#### **4.4.5 Qualification de la performance**

On distingue trois phases :

- QP1 : vérification de la performance de la méthode indépendamment de la matrice. La performance attendue est équivalente à celle annoncée par le fournisseur.
- QP2 : qualification des performances de la méthode sur les échantillons à analyser.
- Etude d'équivalence : preuve(s) que les résultats obtenus avec la MA sont au moins équivalents à ceux obtenus avec la méthode de référence, pour le produit à analyser.

#### **4.4.6 Les critères de performances**

Les exigences de performances, lors de l'étude comparative entre la méthode officielle et la méthode alternative dépendent de la nature du test. En effet, une méthode quantitative, qualitative ou d'identification n'a pas les mêmes critères de performance à démontrer, comme illustré ci-dessous (Table XV).



**Table XV : Les critères de validation des méthodes microbiologiques**

<b>Critères de performance</b>	<b>Méthode quantitative (absence/présence)</b>	<b>Méthode qualitative (dénombrement)</b>	<b>Méthode d'identification</b>
Exactitude	X	X	X
Fidélité	X	X	X
Spécificité	X	X	
Robustesse	X	X	X
Limite de détection	X		
Limite de quantification		X	
Linéarité		X	
Intervalle de mesure		X	
Comparaison avec la méthode de référence	X	X	X

Les critères de performance sont définis en annexe 1.

Quand la validation est réalisée et approuvée, le changement de méthode analytique doit être enregistré auprès des autorités de santé. Ce processus peut durer entre 4 et 6 mois [31]. La nouvelle technique pourra ensuite être utilisée en routine. Afin que l'implémentation d'une MA soit la plus simple possible, il est conseillé que l'acheteur travaille en collaboration étroite avec le fabricant et les autorités de santé.

## 5 Les différentes familles de méthodes alternatives

Les méthodes alternatives qui ont pour principe de diminuer le délai nécessaire pour obtenir un résultat d'analyse, sont basées sur une étape directe ou indirecte de détection des composants de la membrane cellulaire. Dans certains cas, le signal est obtenu après une étape d'enrichissement. Ces méthodes sont classées selon le principe technologique : les techniques dépendantes de la croissance microbienne, et les techniques indépendantes de la croissance microbienne. Nous nous intéresserons ici qu'aux méthodes quantitatives de dénombrements de micro-organismes.

### 5.1 Les méthodes dépendantes de la croissance microbienne

Ces techniques nécessitent la croissance microbienne mais avec un moyen de détection plus rapide que le trouble microbien ou la formation de colonie visible à l'œil nu.

#### 5.1.1 L'ATP Bioluminescence

L'Adénosine Triphosphate (ATP) est un marqueur de viabilité cellulaire, l'ensemble des cellules vivantes stocke de l'énergie sous forme d'ATP. La présence d'ATP dans un échantillon revient à détecter des micro-organismes vivants.

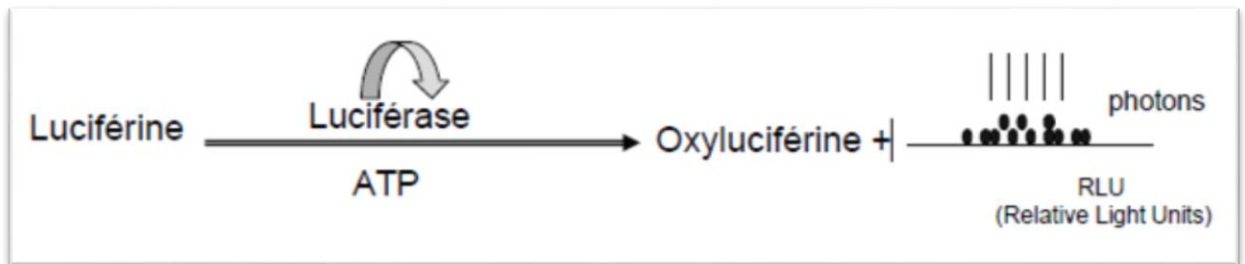
Le dosage de l'ATP est basé sur une réaction enzymatique qui existe naturellement chez un certain nombre d'êtres vivants (comme la luciole, Figure 3), la bioluminescence.



Figure 3 : La luciole, *Photinus pyralis*

L'ATP-métrie utilise le complexe luciférine-luciférase (isolé chez la luciole) pour doser de l'ATP. Ce complexe enzymatique, en présence d'oxygène et de magnésium, transforme l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP en lumière (Figure 4). La quantité de lumière émise étant proportionnelle à la quantité d'ATP. Il suffit donc de mesurer la quantité de lumière émise, à

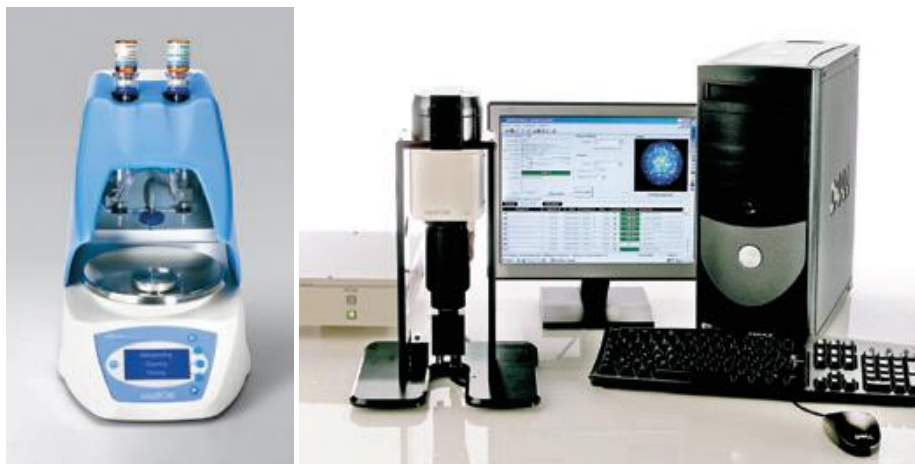
l'aide d'un luminomètre, en Unité Relative de Lumière (URL), pour déterminer la quantité d'ATP initialement présente et donc le nombre de micro-organismes présent dans l'échantillon [32].



**Figure 4 : La réaction de bioluminescence**

Dans le cas de la bio-contamination de l'environnement, les produits développés ont une application pour le prélèvement des surfaces et des opérateurs. On compte parmi les produits sur le marché le PhotonMaster® (AquaTools), le Lumitester® (Kikkoman) et le Pallchek® (Pall).

On retrouve également le système de détection et de numération Milliflex® Rapid (Millipore) (Figure 5). Cette méthode automatisée peut être utilisée pour les échantillons filtrables prélevés tout au long du procédé de fabrication [33]. Le système Milliflex® Rapid utilise la technologie d'imagerie d'ATP pour détecter les MO viables *via* une caméra, il associe la bioluminescence d'ATP avec un système d'amplification du signal.



**Figure 5 : Le système Milliflex® Rapid**

Le temps de détection pour la plupart des MO *via* le système Milliflex® Rapid est situé entre 4 et 48 heures. L'analyse d'images pour le dénombrement des MO détectés est possible. Cette méthode peut également être utilisée pour les tests de stérilité [34] et [35].

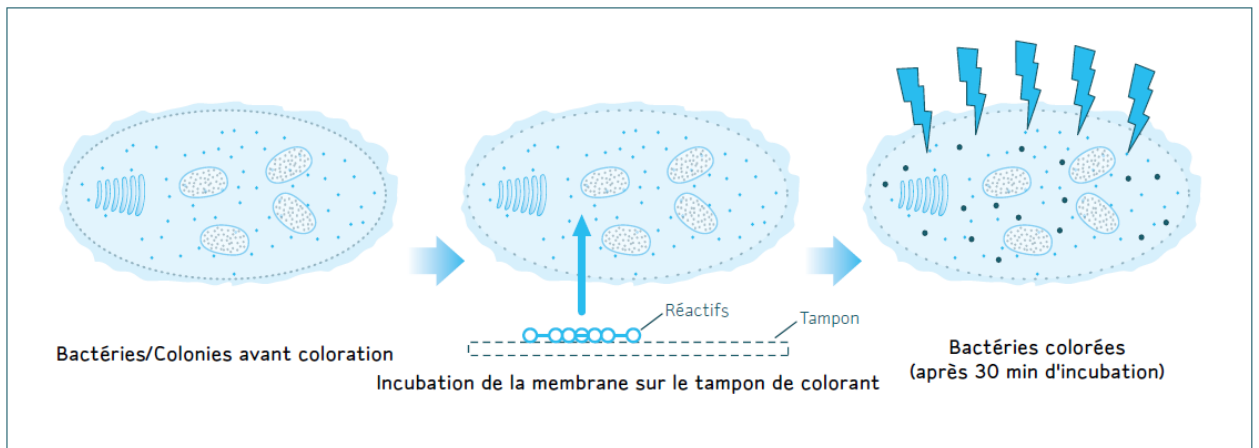
### **5.1.2 L'impédancemétrie**

Cette technique est fondée sur la mesure des variations d'impédance (ou de conductance) dans un milieu de culture où se développent des micro-organismes. L'activité métabolique et la croissance des micro-organismes dans un milieu de culture entraînent la production de métabolites fortement chargés à partir de composés organiques faiblement chargés. Ces modifications électriques vont être mesurées, à partir de récipients reliés à des électrodes contenant l'échantillon à analyser. Le temps de détection est inversement proportionnel à la quantité de micro-organismes initialement présents dans l'échantillon.

Plusieurs types d'appareils sont actuellement commercialisés : le Bactometer® (bioMérieux), et le Malthus® (Malthus Diagnostics) [36].

### **5.1.3 La fluorescence**

Des méthodes alternatives sont conçues pour permettre une détection quantitative rapide s'appuyant sur la fluorescence des MO. Par exemple, le système Milliflex® Quantum (Millipore) est basé sur une technique de coloration fluorescente. Après filtration et incubation de la membrane, le réactif permettant le marquage fluorescent est appliqué à tous les micro-organismes viables. Ce marquage s'effectue à travers le clivage enzymatique d'un substrat par le métabolisme actif microbien, ce clivage va permettre la libération d'un fluorochrome dans le cytoplasme des micro-organismes (Figure 6). À mesure que le fluorochrome s'accumule à l'intérieur des cellules, le signal de fluorescence est naturellement amplifié. Les colonies sont ensuite exposées dans le lecteur Milliflex® Quantum à des rayons lumineux de la longueur d'onde d'excitation du fluorochrome, permettant un comptage à l'œil nu [37].



**Figure 6 : Principe de la coloration fluorescente [37]**

Le système Milliflex® Quantum (Figure 7) est simple à utiliser (étapes détaillées décrites dans l'annexe 2), il est peu encombrant et peut être installé sur un simple plan de travail. De plus, le caractère non destructif de cette méthode permet aussi, à l'aide des méthodes actuelles, d'identifier tout micro-organisme détecté initialement grâce à la coloration fluorescente. Des résultats comparables à ceux obtenus avec les méthodes traditionnelles sont obtenus après un délai situé entre 8 et 48 heures pour la plupart des MO. Les applications potentielles de cette technologie sont nombreuses : matières premières, échantillons prélevés au cours du procédé de fabrication, produits finis, échantillons prélevés dans l'environnement, et sur des échantillons d'eaux [38] et [39].



**Figure 7 : Le système Milliflex® Quantum [37]**

### 5.1.4 L'auto-fluorescence

Le principe d'auto-fluorescence est basé sur la capacité des cellules vivantes à absorber la lumière et à émettre naturellement de la lumière grâce à ces constituants cellulaires (flavines et ses dérivés, pigments photosynthétiques...). Les méthodes alternatives utilisant le principe d'auto-fluorescence permettent de détecter les micro-organismes, après culture sur un milieu gélosé, avant qu'il ne soit visible à l'œil nu.

Après filtration des échantillons, la membrane est placée sur une gélose, puis incubée. Pendant l'incubation, un laser excite les micro-colonies à auto-fluorescence, qui sont automatiquement dénombrées par un système d'imagerie. Les particules qui ne montrent pas de croissance (pas de modification de la taille) au fil du temps sont écartées par le logiciel. A noter que cette méthode est non destructive, le milieu gélosé peut continuer l'incubation afin d'obtenir des colonies plus importantes. Ces échantillons pourront, si nécessaire, être utilisés par la suite pour une identification microbienne.

L'auto-fluorescence est utilisée pour de nombreuses applications (suivi environnemental et bioburden). Actuellement sur le marché, le Growth Direct System® (RapidMicro biosystems) [40], il utilise un système d'imagerie numérique pour détecter les MO présents dans l'échantillon, bien avant qu'ils soient visibles à l'œil nu (Figure 8). Cette technologie peut être utilisée pour le contrôle environnemental (contrôle de l'air, des surfaces et du personnel), sur les matières premières, ainsi que pour des contrôles au cours du procédé de fabrication, sur l'eau, ou encore pour des essais de stérilité [41].



**Figure 8: Détection des micro-organismes par le Growth Direct System® [40]**

Pour l'analyse microbienne de l'air, de nombreux collecteurs sont actuellement sur le marché dont le BioLaz Real-Time Microbial Monitor® (Particle Measuring Systems), le IMD-A®

(BioVigilant) [42] et [43], le BioTrak® Real-Time Viable Particle Counter (TSI Inc) [44] et le RMS-UM® (Instant Bioscan) [45].

## **5.2 Les méthodes indépendantes de la croissance microbienne**

Les technologies reposant sur la viabilité cellulaire sont souvent utilisées par les industriels. Elles permettent de différencier les cellules mortes des cellules vivantes, et déterminent les caractéristiques morphologiques et/ou physiologiques des cellules par mesure de leurs propriétés optiques.

### **5.2.1 Fluorescence et principe de la cytométrie**

La détection et le dénombrement des MO viables sont réalisés à l'aide d'un marqueur de viabilité fluorescent, sans qu'une étape de croissance microbienne soit nécessaire. La cytométrie permet de détecter les MO qui sont difficilement cultivables, et de dénombrer les MO en temps quasi réel : en quelques heures voire en quelques minutes.

La cytométrie en phase solide sera abordée en détail lors de notre étude de cas : la technologie ScanRDI®. L'équipement le plus récemment mis sur le marché (en 2015), le PTS Micro System®, conçu par le laboratoire Charles River, est particulièrement compact. Les résultats sont obtenus en seulement 30 minutes, ses applications potentielles sont nombreuses : validation du nettoyage, contrôle microbiologique des cultures cellulaires, de l'eau... Cette dernière technologie qui s'apparente à une miniaturisation de la technologie ScanRDI® devra cependant faire ses preuves.

La cytométrie en flux (CMF) permet l'analyse d'éléments en suspension : constituants cellulaires, organites isolés, ou cellules. Chaque élément est analysé un à un avec mesure simultanée de différents signaux optiques ou physiques émis par la particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs aux propriétés optiques intrinsèques et aux propriétés optiques induites de fluorescence des particules. Les propriétés optiques intrinsèques correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule (petit angle ou Forward Scatter : FSC) et à leur structure interne (grand angle ou Side Scatter : SSC). Les propriétés optiques induites de fluorescence sont obtenues par des marquages spécifiques de récepteurs membranaires et/ou cytoplasmiques par des anticorps

monoclonaux couplés à des fluorochromes. Ce procédé d'analyse « cellule par cellule » est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde.

Le cytomètre en flux est composé de trois éléments principaux (Figure 9) :

- Le **système fluide** constitué d'une veine liquide s'écoulant à vitesse constante qui entraîne et focalise un deuxième flux liquide contenant l'échantillon. Ce système permet le centrage hydrodynamique des éléments.
- Le **système optique** composé d'un laser (source optique d'excitation des fluorochromes) et de lentilles pour focaliser le faisceau laser. Le système optique de réception est constitué d'une lentille pour collecter la lumière émise, de miroirs et de filtres optiques pour diriger les longueurs d'onde spécifiques sur les photomultiplicateurs. Ces derniers permettent de convertir l'énergie lumineuse en énergie électrique.
- Le **système électronique** convertit les signaux optiques en signaux électriques grâce à des photomultiplicateurs. Les photomultiplicateurs sont des capteurs optiques capables de détecter de très petites quantités de lumière et de le retranscrire en signal électrique, numérique ou analogique selon le cytomètre. Ils vont donc traduire l'intensité de la lumière qui leur parvient.



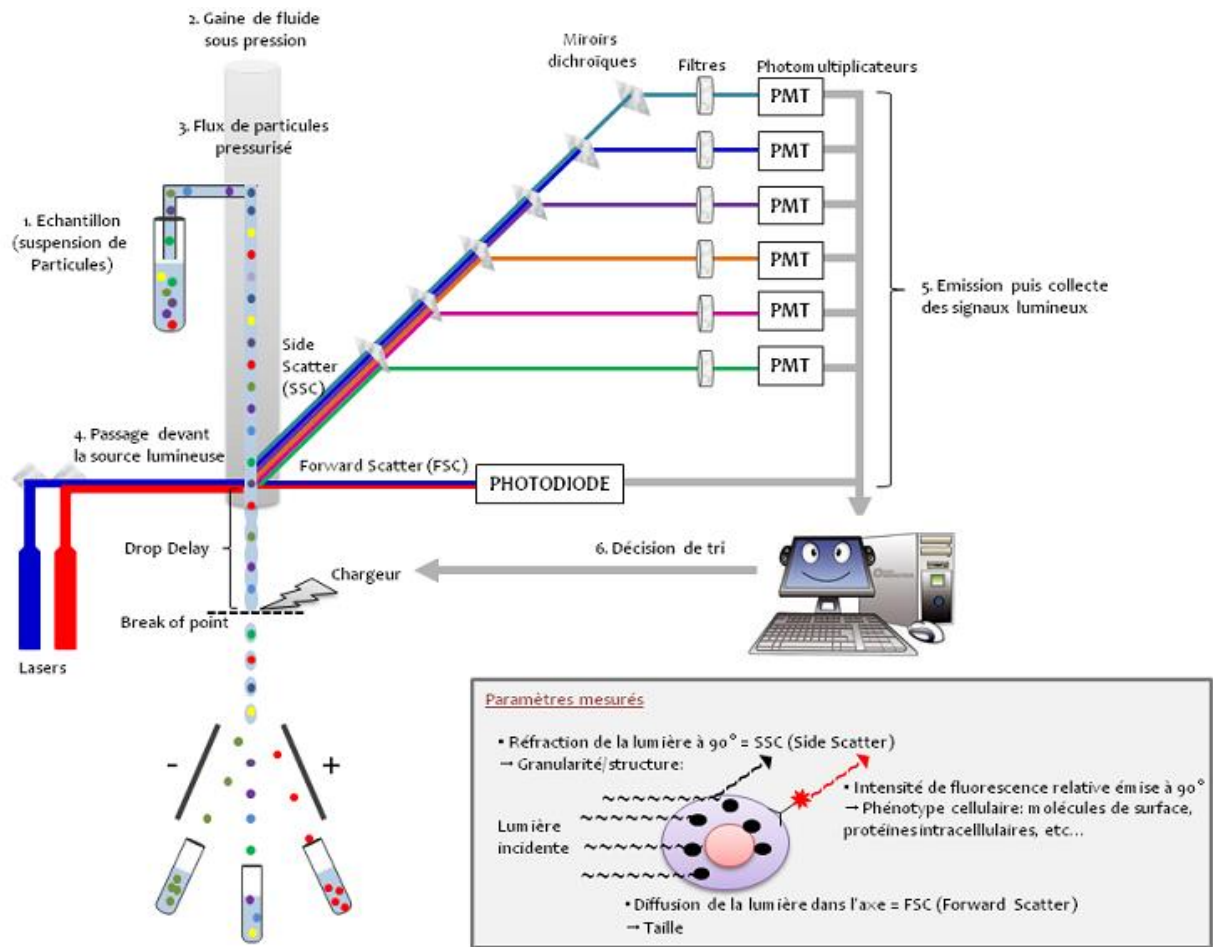
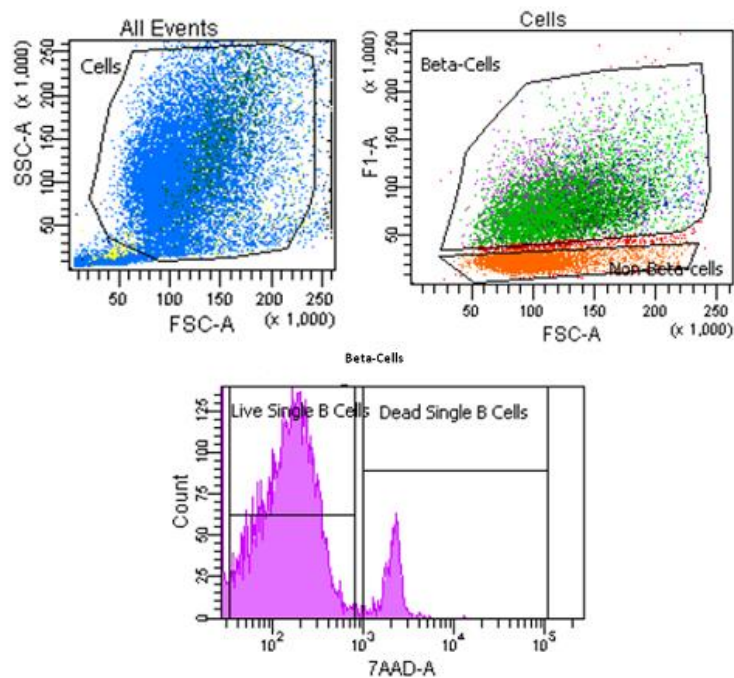


Figure 9 : Représentation schématique d'un cytomètre en flux [46]

Un **système informatique** permet de présenter les résultats. Il stocke les valeurs numériques issues des convertisseurs et présente les résultats sur les écrans des cytomètres sous deux formes (Figure 10) :

- des histogrammes monoparamétriques où l'axe des abscisses représente l'intensité du signal analysé et l'axe des ordonnées le nombre de cellules.
- des histogrammes biparamétriques ou cytogrammes présentant deux signaux simultanément.



**Figure 10 : Résultats d'analyse par la CMF [47]**

Le signal de fluorescence est obtenu grâce à l'utilisation de fluorochromes [48]. Ces molécules ont la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse et de la restituer, généralement avec une énergie plus basse (une longueur d'onde plus grande). Ces molécules fluorescentes sont de taille et de nature chimiques diverse ; certaines sont suffisamment petites pour être conjuguées à d'autres molécules (comme dans le cas des anticorps couplés à un fluorochrome); d'autres ne sont fluorescentes que dans certains états de chélation (marqueurs fluorescents vitaux, qui ne sont fluorescent que complexé à l'ADN). On cite :

- les petites molécules chimiques : FITC (Fluoresceine isothiocyanate), Cy5, Cy7, Alexa.
- les protéines : PE (Phycoerythrine), APC, PerCP.
- les tandems : PE-Cy5, PE-Cy5.5, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC-Cy7.
- les protéines auto fluorescentes : GFP et ses dérivés.

Pour sélectionner un fluorochrome, il faut s'assurer que :

1. le spectre d'excitation est compatible avec l'équipement laser du cytomètre,
2. les spectres d'émission sont non chevauchants,
3. le fluorochrome associé au marqueur antigénique le plus faiblement exprimé soit le plus fort (Figure 11).

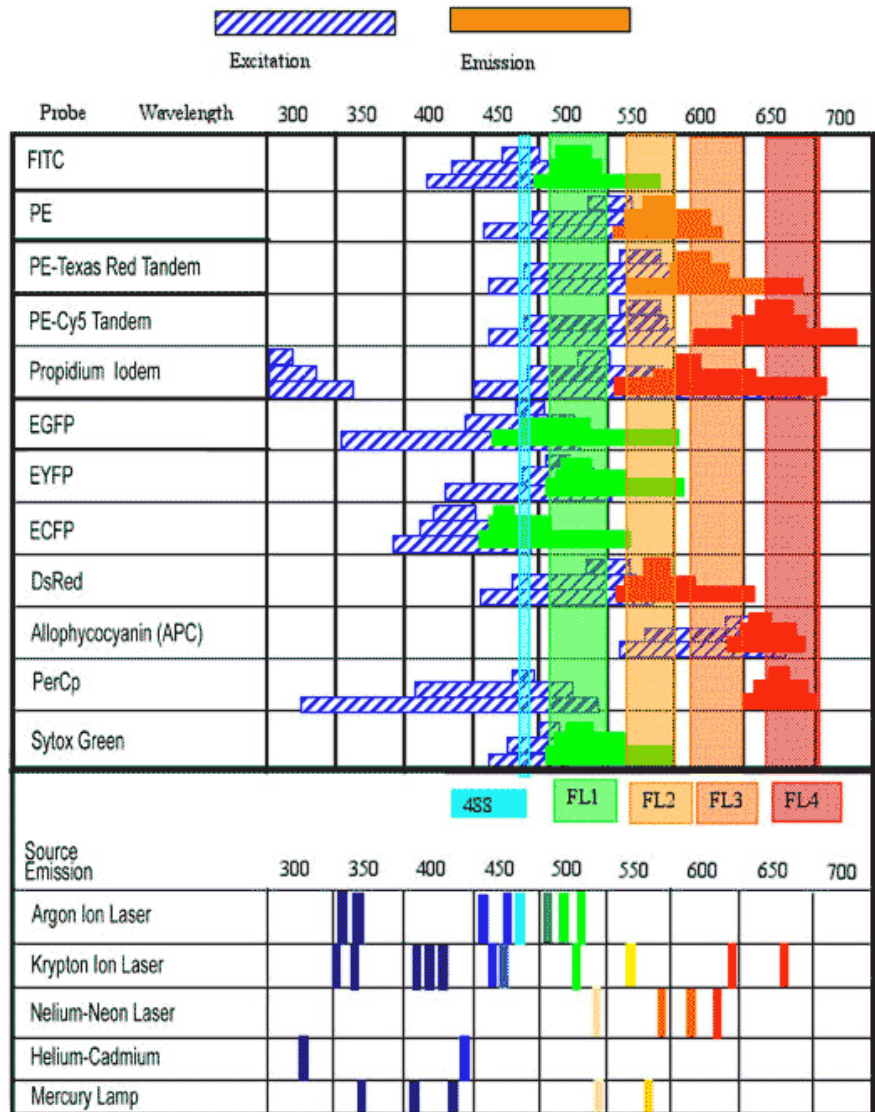


Figure 11 : Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des principaux fluorochromes utilisés en CMF [49]

Les fluorochromes sont capables de diffuser à travers des cellules intactes et de se fixer sur leurs cibles. Le marquage se fait par simple incubation à 37 °C, à l'abri de la lumière, suivie parfois de rinçage en milieu de culture. Les cibles de marquage au sein d'un MO sont nombreuses (Figure 12) [50].

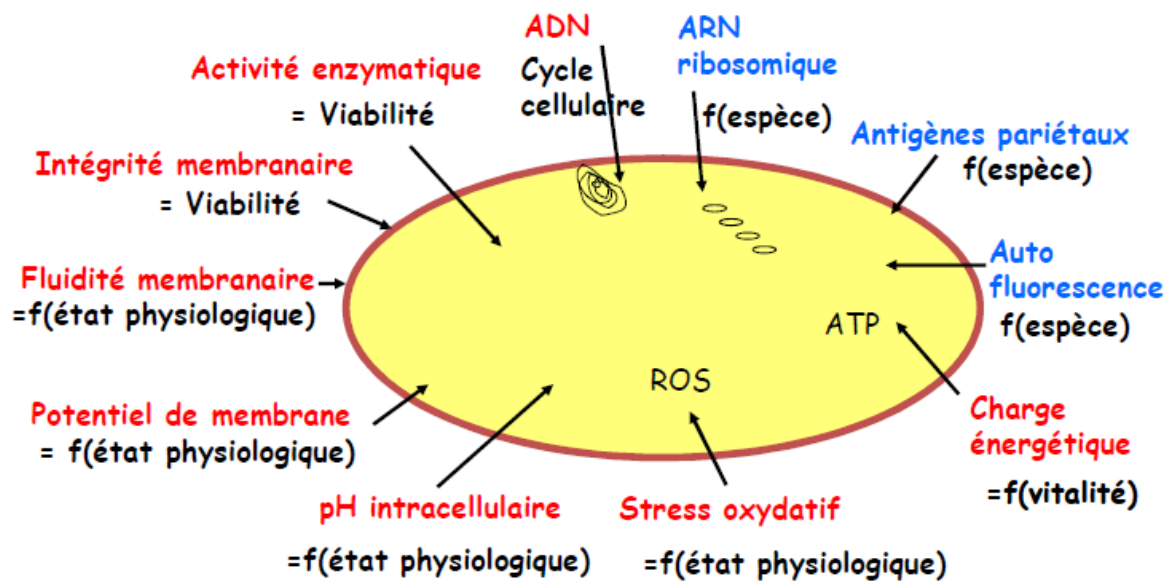


Figure 12: Cibles de marquage d'un micro-organisme [51]

La CMF est très utilisée dans le domaine médical (hématologie). Elle est également particulièrement adaptée au contrôle microbiologique des produits difficilement filtrables : produits laitiers, jus de fruits et cosmétiques. La comptabilisation des signaux détectés pour un volume d'échantillon donné permet de connaître le nombre de bactéries vivantes par unité de masse ou de volume de l'échantillon à analyser. Dans l'industrie pharmaceutique, cette technique peut être utilisée pour le contrôle microbiologique des matières premières, de l'eau, sur le produit au cours du procédé de fabrication ou sur le produit fini. Plusieurs technologies sont disponibles. Le Bactiflow®, commercialisé par le laboratoire bioMérieux, permet d'obtenir des résultats en seulement 30 minutes. Cette méthode est principalement utilisée pour les essais de stérilité et le bioburden des produits non filtrables. Une version plus automatisée est également disponible : le DCount® [52].

### 5.2.2 L'auto-fluorescence et PAT

L'avenir pour les méthodes alternatives est l'automatisation du plus grand nombre d'étapes possibles et jusqu'à la mesure en ligne directe, supprimant ainsi la phase de croissance et permettant de réaliser l'analyse sur le lieu de production, au plus près du produit et du producteur, qui a la responsabilité de la qualité microbienne et de sa maîtrise.

Par exemple, la technique 7000 RMS® (Figure 13), commercialisée par la société Mettler Toledo, réalise un contrôle microbien, en ligne et en continu, pour les eaux à usage pharmaceutique. C'est une technologie optique de fluorescence induite par laser [53].



**Figure 13 : Le 7000 RMS® [53]**

Elle permet d'analyser le traitement des eaux, des cuves de stockage, des boucles de distribution, des points d'utilisation et des procédés de nettoyage en place. L'analyseur accepte directement des échantillons d'eau pouvant atteindre jusqu'à 90 °C. Cette technologie mesure instantanément, et affiche en temps réel, la contamination microbienne (d'une cellule/100 ml à 2000 cellules/ml) et des particules inertes (à partir d'une taille de 0,52 µm). L'appareil est simple à utiliser, il ne requiert ni de préparation d'échantillon ni de réactif. Les résultats peuvent être directement communiqués à des logiciels informatiques. Le 7000 RMS® présente donc de réels avantages par rapport aux méthodes dépendantes des conditions d'incubation, des milieux de culture, des réactifs et du temps.

### **5.2.3 La spectroscopie Raman**

Il s'agit d'une méthode basée sur l'excitation vibrationnelle des molécules par un laser (photons) afin de réémettre une radiation spécifique qui sera collectée et analysée par un détecteur. Une identification est possible d'après une base de données. Cette technique est surtout utilisée pour une application de prélèvement d'air mais également pour l'analyse des eaux avec l'identification d'agent de guerre biologique. On compte parmi les automates utilisant cette technique le Bio Particle Explorer® (rap.ID) et le REBS® (Battelle).

### 5.3 Le ScanRDI® : une des principales méthodes alternatives utilisée dans l'industrie pharmaceutique

Les méthodes classiques des tests de dénombrement des germes détectent uniquement les microorganismes cultivables. Les résultats des tests sont obtenus en 5 à 14 jours, et dépendent du milieu de culture utilisé. Face à ce délai, il n'est pas toujours possible de détecter tous les problèmes de contamination, ou la détection ne se fait pas assez tôt dans la chaîne de production. Ce délai, trop long de détection peut conduire à la perte du produit, et augmente le temps de cycle. La méthode ScanRDI® est une véritable révolution dans le contrôle microbiologique. Elle permet de détecter, à partir d'un échantillon filtrable, tous les micro-organismes viables en seulement 2 ou 3 heures, sans passer par une étape de culture (table XVI). C'est une technologie unique pour le dénombrement direct en temps réel avec une sensibilité de 1 micro-organisme, basée sur la cytométrie en phase solide. Le ScanRDI® a été développé par la société AES-Chemunex, racheté en 2012 par la société bioMérieux.

**Table XVI : Comparaison de la méthode standard de la pharmacopée et la méthode ScanRDI®**

Méthode standard	Méthode ScanRDI®
Résultats en 5 à 14 jours	Résultats en moins de 6 heures (2 ou 3 heures pour la préparation)
Dépendant du milieu de culture	Pas de culture
Uniquement pour les microorganismes viables et cultivables	Détection de tous les microorganismes viables
Quantification limitée : 1 à 100 UFC	Quantification de 1 à 10 <sup>E</sup> +5 cellules

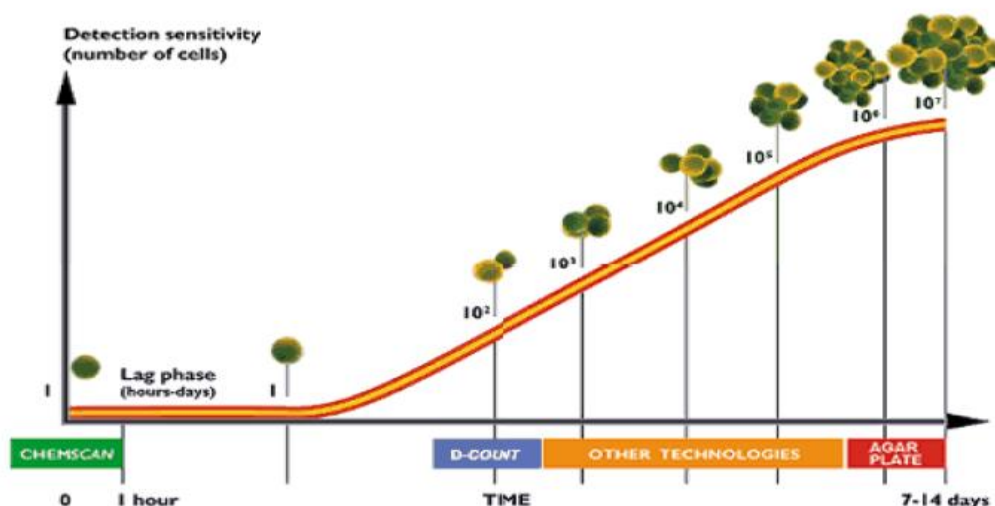


Figure 14: Seuil de détection des différentes techniques [54]

La réduction du délai d'obtention des résultats par la méthode ScanRDI® (Figure 14), permet de diminuer le temps de cycle du produit et d'avoir une meilleure réactivité en cas de contamination. En détectant la contamination le plus tôt possible, les industriels peuvent mettre en place des actions correctives et préventives plus rapidement.

Enfin, les résultats obtenus sont plus fiables : la lecture des résultats est automatique, la méthode est indépendante des conditions de culture des microorganismes. La FDA approuve et encourage la mise en place de la technologie ScanRDI® [55].

### 5.3.1 Principe de la méthode ScanRDI®

Le ScanRDI® permet de dénombrer les micro-organismes viables (pas forcément cultivables), dans un produit filtrable, grâce à l'utilisation d'enzymes présentes dans tous les microorganismes. C'est une technique basée sur la cytométrie en phase solide.

Les contaminants microbiens retenus sur la membrane d'un filtre sont marqués à l'aide d'un fluorophore, indicateur de viabilité (Figure 15). La détection est automatisée, le dénombrement se fait par excitation laser puis balayage automatique (Figure 16). Des détecteurs enregistrent la fluorescence émise. Des logiciels examinent ensuite tous les événements fluorescents. Ils



affichent le nombre d'événements déterminés à être des cellules et localisent chaque événement sur des cartes.

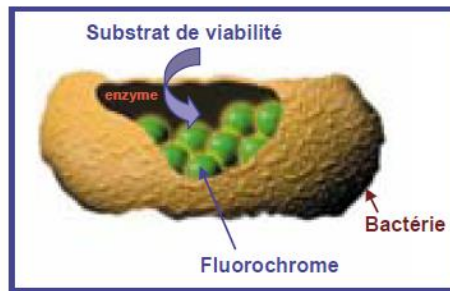


Figure 15: Marquage fluorescent de la bactérie [54]

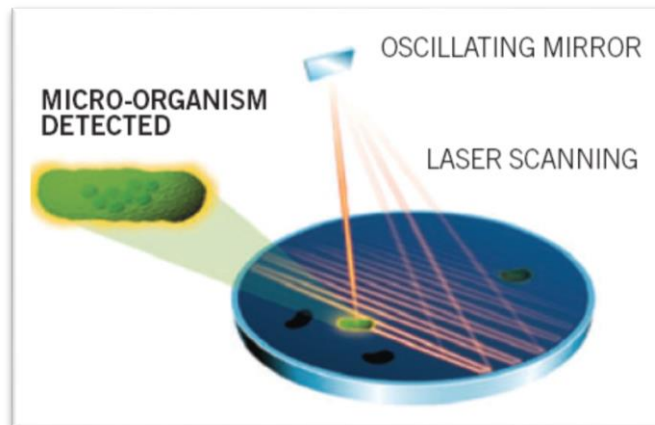
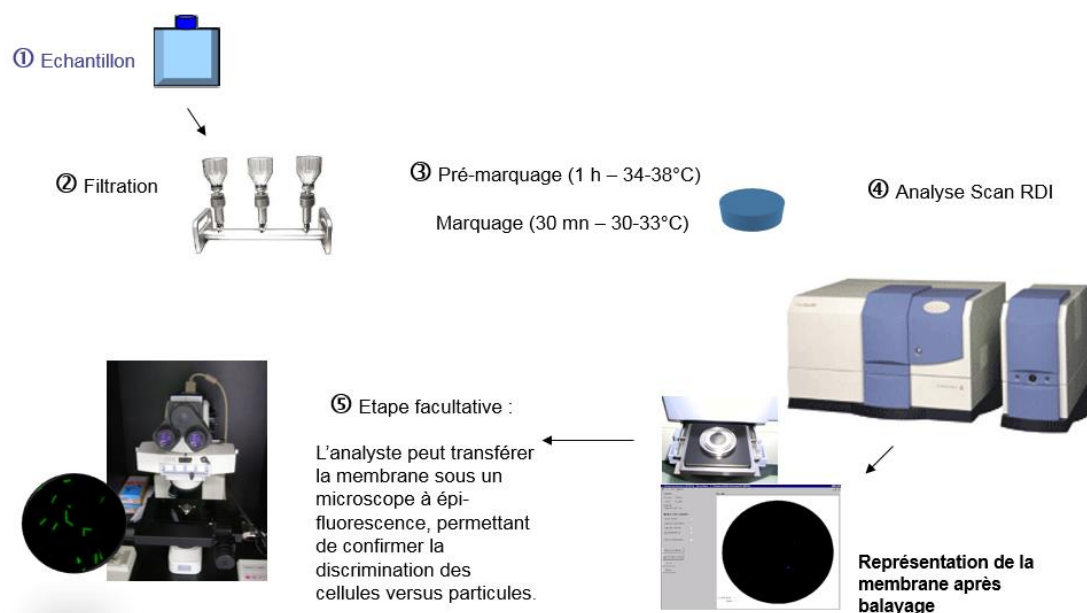


Figure 16: Principe de la méthode ScanRDI® [54]

L'analyse dure environ deux heures, et se fait en plusieurs étapes (Figure 17) :

- 100 ml d'échantillon minimum sont filtrés sur une membrane de 0.4  $\mu\text{m}$ .
- Les cellules sont marquées par le ChemChrome V6. Une fois dégradée par l'activité estérase, ce substrat libère de la fluorescéine à l'intérieur de la cellule. Les cellules sont détectées par cette fluorescence verte.
- Le laser détecte ensuite la fluorescence émise.
- A la fin de l'opération, l'opérateur peut transférer la membrane sur un microscope à épifluorescence afin de différencier les cellules des débris.





**Figure 17: Etapes de l'analyse avec le ScanRDI®**

### 5.3.2 Applications de la technologie ScanRDI®

La méthode ScanRDI® est utilisée dans les industries agroalimentaires et cosmétiques. Ses applications dans l'industrie pharmaceutique sont nombreuses, et présentent des intérêts certains :

- Suivi environnemental : le ScanRDI® est utilisé pour l'analyse microbiologique de l'eau. Par exemple, en cas de redémarrage de production, pour le suivi de nettoyage, pour l'analyse de l'eau pour le contrôle des boucles d'eau, ou encore pour surveiller la formation de biofilm. Les biofilms bactériens sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobés d'une matrice polymérique et attachés à une surface. Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. La détection d'un biofilm est primordiale afin d'anticiper un problème majeur de biocontamination [56].
- Test de bioburden sur le produit en cours de fabrication, sur le produit fini, ou sur les matières premières [57].
- Test de l'efficacité antimicrobienne : le ScanRDI® ayant une linéarité comprise entre  $1$  à  $10^E+5$  cellules par membrane pour les bactéries et  $1$  à  $10^E+4$  cellules pour les moisissures,

il n'est pas indispensable de réaliser de nombreuses dilutions, ce qui permet de diminuer les erreurs, d'économiser du temps et de l'argent.

- **Biochnologie** : La méthode ScanRDI® est utilisée en cas de contamination des cultures cellulaires, ou pour le suivi des fermentations [58]. Pour les cultures cellulaires, un traitement préalable est nécessaire afin d'éliminer les cellules eucaryotes avant de réaliser le test. La réduction du temps pour obtenir les résultats permet de diminuer le temps de cycle, et d'avoir une meilleure réactivité en cas de contamination. Les protocoles de validation ont prouvé que le ScanRDI® a une sensibilité constante jusqu'à 1 million de cellules animales présentes.
- **Test de stérilité** : Dans le cas de matrice simple, l'échantillon peut être facilement filtré, le ScanRDI® peut ainsi être utilisé pour le test de stérilité [59] et [60]. La société Alcon utilise le ScanRDI® pour certains de ces produits : collyres et produits de lentilles. Ce sont des matrices simples, facile à filtrer et sans particule. La méthode est approuvée par la FDA, le résultat du test de stérilité est obtenu en seulement 4 heures. Malheureusement cette application est difficile à mettre en place pour les produits biologiques, ils sont difficiles à filtrer à travers la membrane et la présence de particules inertes risque de donner des faux positifs.

Le ScanRDI® peut également être utilisé lors d'investigation d'OOS, pendant la validation du nettoyage ou encore pour prouver l'efficacité de désinfectant. Le ScanRDI® est principalement utilisé, dans l'industrie pharmaceutique, pour l'analyse microbiologique de l'eau.

### **5.3.3 Etudes d'équivalence ou de comparabilité de la méthode ScanRDI®**

Avant d'être mise en place en routine au laboratoire, la méthode alternative choisie pour remplacer la méthode de référence doit être validée.

Dans la partie 3, nous avons abordé toutes les étapes requises d'une validation. Nous allons ici, nous intéresser tout particulièrement à l'étude d'équivalence entre la méthode ScanRDI® et la méthode de référence.

En effet, lors de la phase QP2 de la validation, qui consiste à qualifier les performances de la méthode, sur chaque type de produit à analyser, des paramètres analytiques doivent être testés.

Dans le cas de la méthode ScanRDI®, les paramètres à tester sont :

- La linéarité
- L'exactitude
- La précision
- La limite de détection
- L'effet du produit sur le marquage de la viabilité
- L'équivalence, c'est-à-dire qu'il faut démontrer que les résultats obtenus avec le ScanRDI® sont au moins équivalents à ceux obtenus avec la méthode de référence.

A partir de l'étude d'équivalence, nous allons évaluer la sensibilité de la méthode ScanRDI® par rapport à la méthode de référence.

De nombreuses études sont publiées sur l'eau purifiée, car c'est la qualité d'eau la plus utilisée par les industries pharmaceutiques, comme diluant dans le produit, pour l'utilisation des équipements, ou encore pour les cycles de nettoyage. Il est donc indispensable de détecter le plus précocement possible une contamination microbienne. Aussi bien d'un point de vue réglementaire que financier, assurer la qualité des eaux à usage pharmaceutique est absolument crucial.

Afin d'illustrer les résultats publiés avec cette technologie, deux exemples sont ci-dessous rapportés :

- Première étude : "Evaluation of the applications of a system for real-time microbial analysis of pharmaceutical water systems"[61]

Les biofilms peuvent se former dans n'importe quel système d'eau, et ont tendance à se localiser préférentiellement dans les zones difficiles à nettoyer.

Afin de surveiller la formation de biofilm, deux types de systèmes d'eau, du même établissement ont été analysés :

- **système d'eau purifiée « nouveau »**, récemment installé pour diminuer la formation de biofilm.
- **Système d'eau purifiée « vieux »**, propice à la formation de biofilm et qui nécessite une attention particulière pour éviter cette possibilité.

Des échantillons des deux systèmes ont été analysés par la méthode ScanRDI®, et par incubation, pendant 5 jours à 32 °C, sur une boîte de Pétri contenant un milieu de culture R2A. La gélose R2A est un milieu de culture spécialement développé pour étudier les bactéries qui vivent normalement dans l'eau potable, il contient peu d'éléments nutritifs. Pour 1 litre de milieu (pH à 25°C :  $7,2 \pm 0,2$ ), la composition de ce milieu est la suivante :

- Extrait de levure : 0,5 g
- Peptone protéose : 0,5 g
- Hydrolysate de caséine : 0,5 g
- Glucose : 0,5 g
- Amidon : 0,5 g
- Phosphate dipotassique : 0,3 g
- Sulfate de magnésium anhydre : 0,024 g
- Pyruvate de sodium : 0,3 g
- Agar agar bactériologique : 15 g

Cette formule-type peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour les deux méthodes, entre 1 à 10 bactéries par ml sont retrouvées avec une bonne corrélation entre les résultats obtenus entre le ScanRDI® et la méthode de référence de la pharmacopée (Figure 18). De plus, ces résultats confirment que la méthode alternative ScanRDI® est capable de détecter des concentrations faibles de micro-organismes.

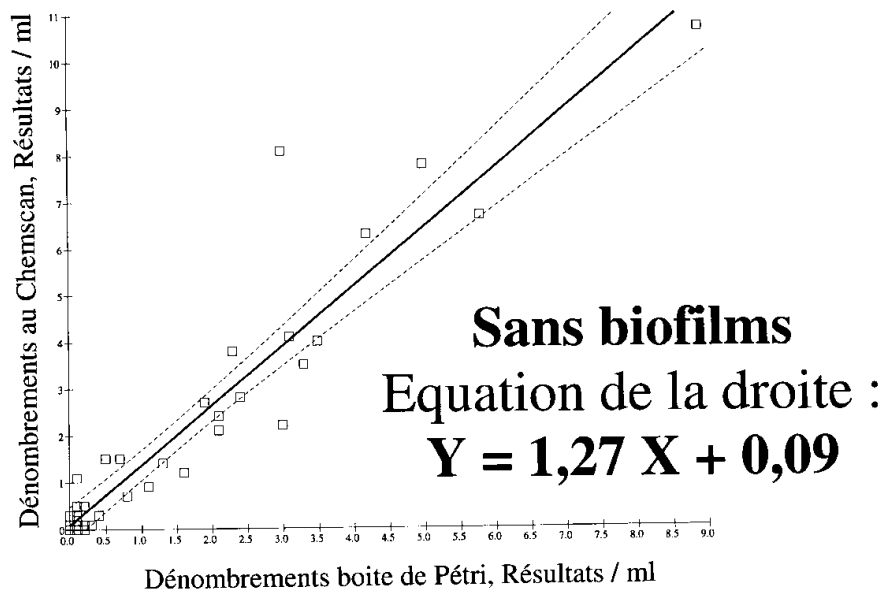


Figure 18: Résultat de la corrélation pour le système d'eau " nouveau ", sans biofilm [61]

Les contaminations présentes dans les échantillons du système d'eau purifiée «vieux» sont bien plus importantes que celles retrouvées dans les échantillons du système d'eau purifiée «nouveau», avec les deux méthodes.

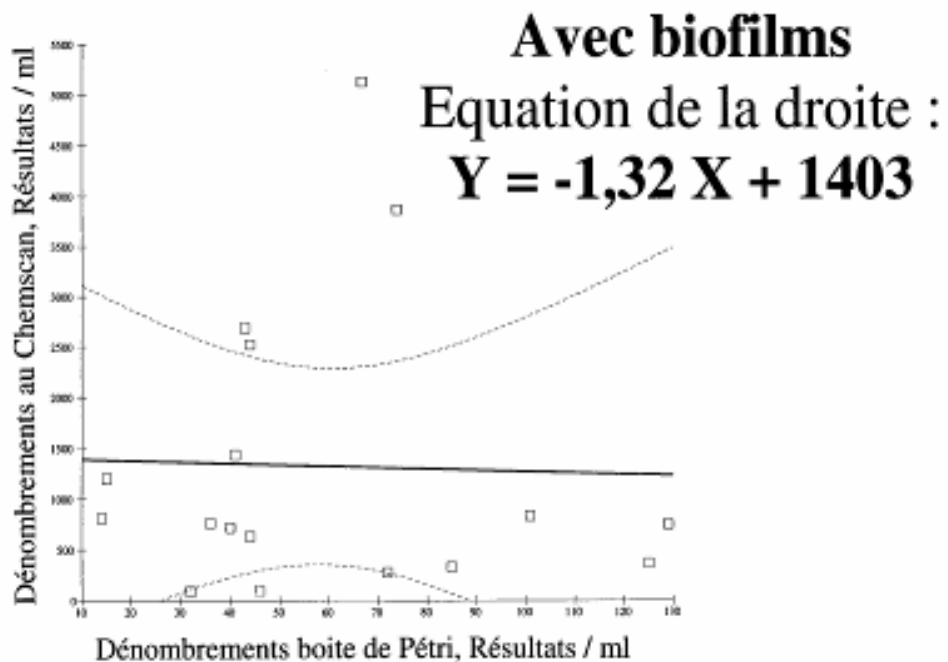


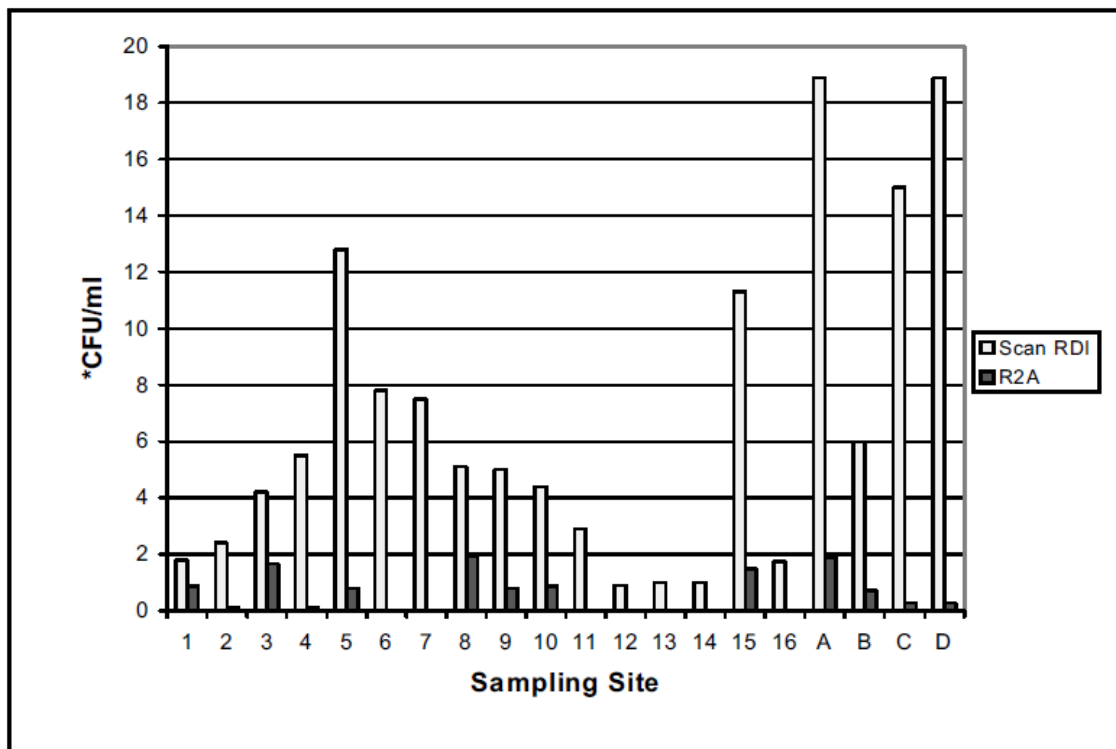
Figure 19: Résultat de la corrélation pour le système d'eau " vieux ", avec possible formation de biofilm [61]

Cependant les contaminations retrouvées avec la méthode ScanRDI® sont beaucoup plus nombreuses, par rapport à celles obtenues par le dénombrement sur boîte de Pétri (Figure 19). En effet, le ScanRDI® a une meilleure capacité à détecter les cellules stressées et les micro-organismes qui exigent des conditions de culture particulières. Ces micro-organismes exigeants n'ont donc pas formés de colonies sur les boîtes de Pétri, ce qui expliquent la différence des résultats obtenus par les deux méthodes.

En conclusion, le ScanRDI® est équivalent à la méthode de référence pour les deux types d'échantillons testés : systèmes d'eau purifiée « nouveau » et « vieux ». La technologie ScanRDI® a une sensibilité beaucoup plus élevée pour détecter les cellules stressées, les spores et les micro-organismes exigeants. Cette étude ne spécifie cependant pas l'identification des contaminants permettant de corroborer cette information. Les résultats ont été obtenus en seulement 90 minutes alors que par la méthode de référence la lecture s'est faite après 5 jours d'incubation. Le ScanRDI® améliore la détection des biofilms et peut détecter des contaminations précoces qui ne sont pas visibles sur les boîtes de Petri.

➤ Deuxième étude : “Validation for the ScanRDI for routine microbiological analysis of process water ”[62]

Des systèmes d'eau purifiée, non stagnante, dont le contenu du réservoir est renouvelé toutes les 20 minutes ont été testés sur 16 sites de systèmes d'eau purifiée (1 à 16 - Figure 20) et 4 plus petits systèmes d'eau purifiée (A à D - Figure 20). Des échantillons de 100 ml d'eau purifié ont été prélevés, de façon aseptique, sur une période de 3 mois sur chaque système. Les échantillons ont été analysés, en même temps, par la méthode ScanRDI® et par la méthode de référence de la pharmacopée. Pour le dénombrement sur boîte de Petri, une gélose R2A a été utilisée, l'incubation a duré 5 jours minimum, à 30-35 °C.



**Figure 20 : Comparaison des méthodes ScanRDI® et du dénombrement sur boîte de Pétri, sur 20 sites d'échantillonnage différents [62]**

La méthode ScanRDI® est supérieure à la méthode de référence (Figure 20). En effet, le ScanRDI® détecte des contaminations sur des échantillons alors qu'aucune contamination n'est retrouvée sur les boîtes de Petri (échantillons 6,7, 11, 12, 13 et 14 - Figure 20).

Les deux précédentes études ont prouvé que la méthode alternative ScanRDI® est équivalente, ou supérieure, à la méthode classique de dénombrement pour détecter des contaminations dans des échantillons d'eau purifiée. Elle est même plus sensible, car elle détecte tous les micro-organismes viables. Elle permet de détecter de façon précoce des micro-organismes qui nécessitent des conditions de culture exigeantes. Les résultats de la contamination sont obtenus en seulement 2 heures, alors que pour la méthode classique le délai est de minimum 5 jours.

Pour conclure, la méthode ScanRDI® est très sensible, elle détecte tous les micro-organismes viables présents dans l'échantillon, sans qu'une phase de croissance soit nécessaire. Sa rapidité d'obtention des résultats permet aux industriels de mettre des actions correctives rapidement et de

diminuer le temps de cycle du produit (table XVII). Sa mise en place en routine dans un laboratoire nécessite cependant des ressources financières et humaines importantes : investissement pour l'équipement (environ 250 000 euros), qualification et validation de la technique, formation du personnel... De plus, contrairement aux méthodes de la pharmacopée, sa capacité d'analyse est limitée (ScanRDI®  $\approx$  20 échantillons par jour, méthode pharmacopée  $\approx$  150 échantillons par jour), l'analyse est destructive : l'identification du germe en cas de contamination est impossible. Enfin, on note la présence de faux positifs, dû à l'autofluorescence de particules inertes, dans ce cas une discrimination microscopique est nécessaire.

La méthode ScanRDI® est utilisable pour les matrices simples, afin de pouvoir réaliser l'étape de filtration. L'utilisation du ScanRDI® pour l'analyse de l'eau purifiée est la plus adaptée. Plusieurs études ont prouvés son équivalence et même sa supériorité en termes de sensibilité par rapport à la méthode classique.



**Table XVII : Avantages et inconvénients de la méthode ScanRDI®**

Avantages	Inconvénients
Détection de tous les MO viables	Uniquement pour les produits filtrables
Délai d'obtention des résultats <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 2-3 heures pour un test de bioburden</li> <li>▪ &gt;4 heures pour un test de stérilité</li> </ul>	Méthode destructive : pas d'identification possible après analyse
Sensibilité : 1 cellule	Coût par analyse : environ 30 euros de consommables
Linéarité : 1 à 10 <sup>E</sup> +5 cellules	Investissement pour l'équipement ≈ 250 000 euros
Impact qualité : mise en place d'actions correctives rapides	Formation des opérateurs
Diminution du temps de cycle	Qualification et validation de la méthode
Possibilité de renseigner la morphologie du MO (microscope à épifluorescence)	Faible capacité d'analyses (≈ 15 par jour)
Equipement semi-automatique	Risque de faux positifs

La technologie ScanRDI® particulièrement bien placée dans les laboratoires pharmaceutiques a récemment évolué pour offrir aux utilisateurs un équipement plus compact et une interface informatique plus intuitive ; le ScanRDI2® commercialisé depuis 2014.



## **6 Conclusion**

**THESE SOUTENUE PAR :** Laura TORDJMAN

**TITRE :**

CHALLENGE DU DENOMBREMENT MICROBIEN DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE : LES NOUVELLES METHODES ALTERNATIVES SONT-ELLES APPLIQUEES ?

**CONCLUSION :**

Les contrôles microbiologiques sont indispensables lors de la fabrication de produits pharmaceutiques. Afin de garantir une qualité absolue du médicament, des tests sont réalisés tout au long de la chaîne de production, de la matière première au produit fini. L'environnement de production (l'eau, l'air, les surfaces), ainsi que le personnel sont également soumis à des contrôles très stricts.

Les méthodes dites « traditionnelles » de dénombrement de germes, sont utilisées depuis le XIX<sup>e</sup> siècle. Elles ont les avantages d'être peu coûteuses, simples et standardisées par les Pharmacopées. Cependant, ces méthodes nécessitent la croissance des micro-organismes dans un milieu de culture, les résultats sont obtenus après un long délai d'incubation, entre 5 et 14 jours.

Des nouvelles méthodes alternatives rapides ont été développées ces 30 dernières années. Elles sont particulièrement intéressantes pour les industries pharmaceutiques : obtention des résultats plus rapide, diminution des erreurs humaines, diminution des « Out Of Specifications »... L'utilisation des méthodes alternatives permet ainsi d'avoir une qualité accrue du produit et une meilleure maîtrise du procédé de fabrication. Néanmoins, les entreprises sont confrontées à un contexte réglementaire compliqué, les lignes directrices aujourd'hui disponibles sont encore insuffisantes. Même si l'implémentation d'une méthode alternative est un processus complexe, qui nécessite du temps et un investissement important (coût associé aux équipements, à la validation de la méthode, et à la soumission des variations réglementaires, si besoin) l'utilisation d'une méthode alternative en routine n'est pas impossible et présente des intérêts certains.

Par exemple, la méthode ScanRDI<sup>®</sup> est une véritable révolution dans le contrôle microbiologique. Elle permet de détecter, à partir d'un échantillon filtrable, des micro-organismes vivants en seulement 2 ou 3 heures. Cette technique est couramment utilisée. Plusieurs industries pharmaceutiques l'utilisent en routine (GlaxoSmithKline, Sanofi, Pfizer...), après approbation par les autorités de santé pour différentes applications (analyses microbiennes des boucles d'eau, suivi de nettoyage, redémarrage de production...).

Les autorités de santé, encouragent également la mise en place des « Process Analytical Technologies ». L'utilisation des méthodes alternatives avec le contrôle microbiologique en temps réel, est un bon exemple d'application du PAT. L'avenir pour les méthodes alternatives est l'automatisation du plus grand nombre d'étapes possibles et jusqu'à la mesure en ligne directe, supprimant ainsi la phase de croissance et permettant de réaliser l'analyse sur le lieu de production, au plus près du produit et du producteur, qui a la responsabilité de la qualité microbienne et de sa maîtrise.

**VU ET PERMIS D'IMPRIMER**  
Grenoble, le :

**LE DOYEN**



**Pr. Michel SEVE**

**LE PRESIDENT DE LA THESE**

**Pr. Aziz BAKRI**



## Références bibliographiques

- [1] EMEA. Quality of Water for Pharmaceutical use. 2002.
- [2] Ernst T, Rietschel P. Bacterial endotoxin: molecular relationship of structure to activity and function. The FASEB Journal. 1994; Vol.8.
- [3] Bonnes pratiques de fabrication. LD.1. Fabrication des médicaments stériles. Bulletin officiel. 2011. Vol.8 bis.
- [4] US FDA. Guidance for Industry, sterile drug products produced by aseptic processing-current good manufacturing practices. 2004.
- [5] Pharmaceutical Inspection Convention. Guide to good manufacturing practice for medicinal product annexes. 2013.
- [6] Pharmacopée Européenne 7.0 chapitre 2.6.12. Essais de dénombrement microbien. 2011.
- [7] Pharmacopée Européenne 7.0 chapitre 5.1.5. Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stérile. 2011.
- [8] Vassiliadis P, Trichopoulos D, Kalandidi A, et Xirouchaki E. Isolation of salmonellae from sewage with a new procedure of enrichment. Journal of Applied Microbiology. 1978; 44:233.
- [9] Casetta C, Negretti F, Trabattoni C. Microbiological control of pharmaceutical products containing preservatives: drawbacks of the method of membrane filtration. Boll Chim Farm. 1992; 131(7):274.
- [10] PDA. Technical Report N°33. Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Testing Methods. 2013.
- [11] Pharmacopée Européenne 7.0 chapitre 5.1.6. Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique. 2011.

[12] U.S Pharmacopée <1223>. Validation of Alternative Microbiological Methods. 2005.

[13] ICH. Q2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Current Step 4 version. 2005.

[14] Organisation internationale de normalisation. Norme ISO 16140. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Validation des méthodes — Partie 2: Protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence. Version 2. 2016.

[15] Delity S. How pharmaceutical companies can use Lean to realise benefits in the micro QC.lab. Industry Insight. 2011; 52.

[16] Gordon O, Gray J.C, Anders H.J, Staerk A, Schlaefli O, Neuhaus G. Overview of Rapid Microbiological Methods Evaluated, validated and Implemented for Microbiological Quality Control. European Pharmaceutical Review. 2011; 16(2): 9.

[17] Cundell A, Gordon O, Haycocks N, Johnston J, Luebke M, Lewis N, Mateffy J, Weber J.W. Novel Concept for Online Water Bioburden Analysis: Key Considerations, Applications, and Business Benefits for Microbiological Risk Reduction. American Pharmaceutical Review. 2013; 16(3).

[18] Kanapp JE, Sutton S, Dabbah R, Porter D. Developing an Information Chapter in the USP to Demonstrate Equivalency in Microbiological Methods. American Pharmaceutical Review. 2002; 5(2):14.

[19] Guidance for Industry PAT\_ A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Office of Regulatory Affairs, Pharmaceutical CGMPs. September 2004.

[20] Nasr M. Risk-based CMC Review and Quality Assessment: What is Quality by Design?. Industry Conference. 29 Mars 2006; School of Pharmacy – Temple University.

[21] ICH Q8. Pharmaceutical Development. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Current Step 4 version. 2009.

[22] FDA Guidance for Industry. Comparability Protocols – Chemistry, Manufacturing, and Controls Information. 2003.

[23] Parveen S, Kaur S, David S.A, Kenney JL, McCormick W.M, Gupta R.K. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products. *Vaccine*. Octobre 2011; 19;29(45):8012.

[24] Denoya D. The New Microbiological Technology Wave. *Pharma Manufacturing*. 11 janvier 2011.

[25] Miller M.J. A Fresh Look at USP <1223> Validation of Alternative Microbiological Methods and How the Revised Chapter Compares with PDA TR33 and the Proposed Revision to Ph. Eur. 5.1.6. *American Pharmaceutical Review*. 2015; 18(5): 22.

[26] Miller M.J. Microbiology Series. Article 2: The Implementation of Rapid Microbiological Methods (Validation Strategies). *European Pharmaceutical Review*. 2010; 15(2): 24.

[27] Miller M.J. Microbiology Series. Article 3: The Implementation of Rapid Microbiological Methods (FDA Perspectives). *European Pharmaceutical Review*. 2010; 15(3): 18.

[28] ICH. Q9: Quality Risk Management. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Current Step 4 version. 2005.

[29] Miller M.J. Developing a validation strategy for rapid microbiological methods. *American Pharmaceutical Review*. 2010; 13(3): 28.

[30] Miller M.J. Microbiology Series. Article 4: The Implementation of Rapid Microbiological Methods (EMA Perspectives). *European Pharmaceutical Review*. 2010; 15(4): 17.

[31] Newby P. Implementation, validation and registration of rapid microbiological methods. *European Pharmaceutical Review*. 2008; 13(3): 67.

[32] Shama G, Malik D.J. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2013; 216: 115.

[33] MerckMillipore. Tests Milliflex® Rapides. Disponible sous : <https://www.merckmillipore.com/FR/fr/products/industrial-microbiology/bioburden-testing/bioburden-testing-for-pharmaceutical-and-cosmetics-industry/milliflex-platform/milliflex-rapid-testing/> lien en allemand

- [34] Gray JC, Morandell D, Gapp G, Le Goff N, Neuhaus G, Staerk A. Identification of microorganisms after milliflex rapid detection--a possibility to identify non sterile findings in the milliflex rapid sterility test. PDA J Pharm Sci Technol. 2011; 65(1):42.
- [35] Gray JC, Stärk A, Mercier M, Berchtold G. Introduction of a Rapid Microbiological Method as an Alternative to the Pharmacopoeial Method for the Sterility Test. American Pharmaceutical Review. 2010; 15(2): 24.
- [36] Shintani. H. Rapid Assay of Bioburden, Endotoxin and Other Contamination. Chromatography Separation Techniques. 2013; 4: 204.
- [37] Milliflex<sup>®</sup> Quantum Rapid Detection System User Guide, 2010 Millipore Corporation. PF11940 Rev A, 02/2010.
- [38] Meder H, Baumstummeler A, Rouillon S, Chollet R, Ribault S. Detection of Microbial Contaminants in Water Samples Using the Milliflex<sup>®</sup> Quantum System. BioProcess International. 2010; 8(7): 63.
- [39] Meder H, Baumstummeler A, Chollet R, Barrier S. Fluorescence-Based Rapid Detection of Microbiological Contaminants in Water Samples. The Scientific World Journal. 2012.
- [40] London R, Schwedock J, Sage A, Valley H, Meadows J. An Automated System for Rapid Non-Destructive Enumeration of Growing Microbes. 2010; 5(1).
- [41] Rapid Microbio biosystems. Rapid environmental monitoring for high volume testing. Disponible sous: <http://www.rapidmicrobio.com/environmental-monitoring-method>
- [42] Sandle T, Leavy C, Jindal H and Rhodes R. Application of rapid microbiological methods for the risk assessment of controlled biopharmaceutical environments, Journal of Applied Microbiology. 2014; 116:1495.
- [43] Miller M.J, Lindsay H, Valverde-Ventura R, O'conner M.J. Evaluation of the BioVigilant<sup>®</sup> IMD-A<sup>™</sup>, A Novel Optical Spectroscopy Technology for the Continuous and Real-time Environmental Monitoring of Viable and Nonviable Particles. Part I. Review of the Technology and Comparative Studies with Conventional Methods. PDA J Pharm Sci and Tech. 2009; 63: 245.



[44] Niccum D. Real-Time Viable Particle Detection: Benefits, Challenges, and Regulatory Needs. Pharmaceutical Manufacturing. Juin 2012. Disponible sous : <http://www.pharmamanufacturing.com/articles/2012/094/?start=2>

[45] Instant Bioscan. Real-Time Microbial Monitoring System. Disponible sous : <https://www.youtube.com/watch?v=UkZW-QoDWtI>

[46] BFA-Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative-CNRS UMR 8251. Cytométrie en flux et tri cellulaire. Juin 2012. Disponible sous : <http://www.bfa.univ-paris-diderot.fr/spip.php?rubrique99>.

[47] BFA-Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative-CNRS UMR 8251. Cytométrie en flux et tri cellulaire à haut débit. Décembre 2011. Disponible sous : <http://www.bfa.univ-paris-diderot.fr/spip.php?article292>.

[48] Diaz M, Herrero M, Garcia L, Quiros C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. Biochemical Engineering Journal. 2010; 48: 385.

[49] AG Scientific. What is Flow Cytometry ? 2015. Disponible sous: <http://agscientific.com/blog/index.php/tag/emission-of-fluorochrome-molecules/>

[50] bioMérieux. Cytométrie. Disponible sous: <http://www.biomerieux.com/fr/cytometrie>

[51] Bouix M. Journée thématique Microbiologie et Cytométrie – IPP. 23 mars 2015. Disponible sous : <http://www.afcytometrie.fr/index.php/telechargements?download=4:cmfmicrobio-domaines-bouix>

[52] Tracy P.B, Gaida S, Papoutsakis E. Flow cytometry for bacteria: enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes. Current Opinion in Biotechnology. 2010; 21 : 85.

[53] Mettler Toledo. Contrôle microbien en ligne et en continu. Disponible sous : [http://www.mt.com/dam/MTF\\_PROF/58%20087%20053\\_DS\\_Microbial%20Analyzer\\_fr\\_2015\\_10\\_09\\_US\\_RevB\\_LR.pdf](http://www.mt.com/dam/MTF_PROF/58%20087%20053_DS_Microbial%20Analyzer_fr_2015_10_09_US_RevB_LR.pdf)

[54] AES Chemunex. Abrasp Meeting. Pharmaceutical industries, solid phase cytometry; 20 octobre 2011; Sao Paulo. Disponible sous: <http://www.abrasp.org.br/downloads/2011/aes.pdf>

[55] Guyomard S. Validation of a scanning laser system for microbiological quality control analysis. *Pharmaceutical Technology Europe*. 1997; 225: 50.

[56] Rolland X, Herbig E, Guéneq O, Icke B. ChemScan RDI: a real time and ultra-sensitive laser scanning cytometer for microbiology. Applications to water, air, surface and personnel monitoring. 6<sup>th</sup> International Symposium on Protection Against Chemical and Biological Warfare Agents, Stockholm. 10-15 Mai 1998.

[57] Ramond B, Rolland X, Planchez C, Cornet P et al. Enumeration of Total Viable Microorganisms in an Antibiotic Raw Material Using Chem Scan Solid Phase Cytometer. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. Août 2000; 54: 4.

[58] Onadipe A.O. Detection of Microbial Contamination in Cell cultures Using a Laser Scanning System. *Pharmaceutical Technology Europe*. Septembre 2000.

[59] Smith R. Evaluation of the ScanRDI as a Rapid Alternative to the Pharmacopoeial Sterility Test Method: Comparison of the Limits of Detection. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2010; 64:356.

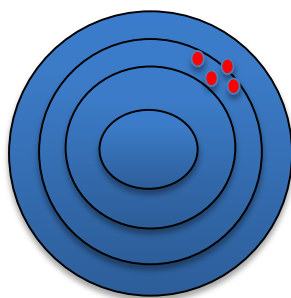
[60] Haghedooren E. Development and Validation approach for a Rapid Sterility Test in a Contract Laboratory to Serve the Pharmaceutical Industry. *Toxikon Europe*, Berlin. 27 février 2012.

[61] Wallner G, Tillmann D, Haberer K. Evaluation of the ChemScan system for rapid microbiological analysis of pharmaceutical water. *PDA J Pharm Sci Technol*. 1999; 53(2): 70.

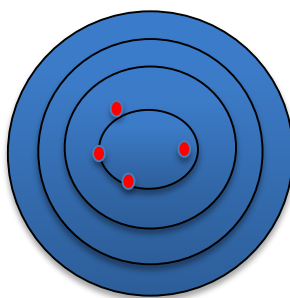
[62] Costanzo S, Borazjani R, McCormick P. Validation of the Scan RDI for routine microbiological analysis of process water. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2002; 56(4): 206.

## Annexe 1 : Définitions des critères de performance

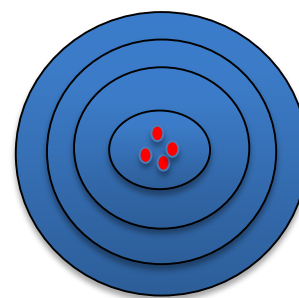
- **Exactitude** : Étroitesse de l'accord entre les résultats respectivement obtenus par la méthode alternative et par la méthode de référence.
- **Fidélité** : Degré d'agrément obtenu entre les résultats individuels lorsque la procédure est appliquée de façon répétée à des échantillons multiples de suspensions homogènes de MO.
- **Spécificité** : Capacité de la méthode à détecter la gamme voulue de MO potentiellement présents dans l'échantillon examiné.
- **Robustesse** : Capacité de la méthode à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres opératoires.
- **Limite de détection** : Correspond au plus petit nombre de MO pouvant être détecté dans un échantillon dans les conditions expérimentales.
- **Limite de quantification** : Correspond au plus petit nombre de MO pouvant être dénombré avec exactitude.
- **Linéarité** : Capacité à produire, sur un certain intervalle, des résultats proportionnels à la concentration des MO dans l'échantillon.
- **Intervalle de mesure** : Intervalle compris entre la plus faible et la plus élevée des concentrations en MO ayant pu être déterminées avec la fidélité, l'exactitude et la linéarité.



**Précision**



**Exactitude**



**Précision et exactitude**

## Annexe 2 : Utilisation du Milliflex® Quantum (Millipore)

### Des tests de biocharge rapides en 3 étapes simples

#### 1. Préparation d'échantillons

Filtrez le volume d'échantillon souhaité à travers une unité de filtration Milliflex® pré-stérilisée et à usage unique. Placez la base de l'unité avec la membrane sur une cassette de milieu gélosé pré-remplie et incubez.



Filtration

Incubation

#### 2. Coloration fluorescente

Transférez la membrane sur un tampon absorbant imbibé au préalable avec le réactif fluorescent et incubez pendant 30 minutes.



Coloration

#### 3. Dénombrement des U.F.C

Dénombrez les colonies fluorescentes à travers la vitre du lecteur Milliflex® Quantum ou utilisez la caméra pour visualiser les colonies sur l'écran de votre ordinateur.



Dénombrement

### Ré-incubez pour une éventuelle identification des micro-organismes

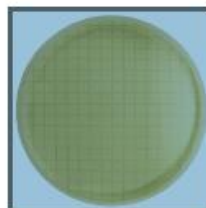
#### Étape de ré-incubation

Placez la membrane sur une cassette de milieu gélosé pré-remplie et ré-incubez. Recouvrez et isolez les micro-organismes, puis identifiez-les à l'aide d'une méthode standard.

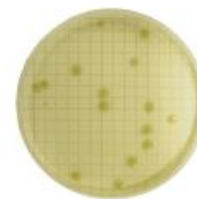
Exemple : Analyse d'un échantillon d'eau non stérile prélevé en cours de procédé à l'aide du système Milliflex® Quantum. Après détection, la membrane a été ré-incubée pour permettre une croissance complète et une identification des micro-organismes.



Plaque de visualisation après coloration.  
Vue de la membrane dans le lecteur.



Les U.F.C. ne sont pas visibles  
en dehors du lecteur.



Après ré-incubation, les U.F.C.  
sont visibles à l'œil nu.

*Faculté de Pharmacie,  
Université Grenoble Alpes.*



# Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Laura TORDJMAN-VALENCY

## **CHALLENGE DU DENOMBREMENT MICROBIEN DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE : LES NOUVELLES METHODES ALTERNATIVES SONT-ELLES APPLIQUEES ?**

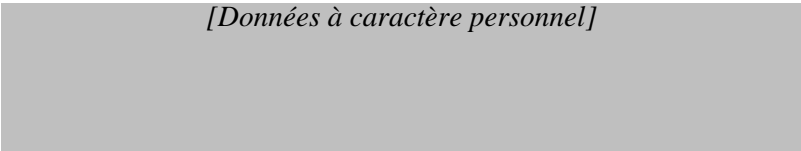
### **RESUME :**

Les contrôles microbiologiques sont indispensables lors de la fabrication de produits pharmaceutiques. Afin de garantir une qualité absolue du médicament, des tests sont réalisés tout au long de la chaîne de production, de la matière première au produit fini. Les méthodes dites « traditionnelles » de dénombrement de germes ont les avantages d'être peu coûteuses, simples et standardisées par les Pharmacopées. Cependant, ces méthodes nécessitent la croissance des micro-organismes dans un milieu de culture, les résultats sont obtenus après 5 à 14 jours d'incubation. Des nouvelles méthodes alternatives rapides ont été développées ces 30 dernières années. Elles sont particulièrement intéressantes pour les industries pharmaceutiques : obtention des résultats plus rapide, diminution des erreurs humaines, diminution des « Out Of Specifications ». Néanmoins, les entreprises sont confrontées à un contexte réglementaire compliqué, les lignes directrices aujourd'hui disponibles sont encore insuffisantes. Même si l'implémentation d'une méthode alternative est un processus complexe, qui nécessite du temps et un investissement important (coût associé aux équipements, à la validation de la méthode, et à la soumission des variations réglementaires, si besoin), l'utilisation d'une méthode alternative en routine présente des intérêts certains. Par exemple, la méthode ScanRDI® est une véritable révolution dans le contrôle microbiologique. Elle permet de détecter, des micro-organismes vivants en seulement 2 ou 3 heures. L'avenir pour les méthodes alternatives est l'automatisation du plus grand nombre d'étapes possibles et jusqu'à la mesure en ligne directe du produit.

**LES MOTS CLES :** Dénombrement microbien, méthodes alternatives, bioburden, méthodes de références Pharmacopée, ScanRDI®.

### **ADRESSE :**

*[Données à caractère personnel]*



**FILIERE :** Industrie