



# LES CONTRÔLES BIOLOGIQUES

**Dr ABBAD Sarra**

Pharmacie Industrielle  
5<sup>ème</sup> année Pharmacie



# PLAN

**I. Introduction**

**II. Contrôle  
microbiologique**

**III. Autres  
contrôles  
biologiques**

**Contrôle des produits  
stériles**

**Contrôle des produits  
non stériles**

**Contrôle microbiologique  
environnemental**

**Toxicité anormale**

**Tolérance oculaire**

**Tolérance cutanée**

# I. INTRODUCTION

- UN CONTRÔLE EST UNE OPÉRATION DESTINÉE À DÉTERMINER, AVEC DES MOYENS APPROPRIÉS, SI LE PRODUIT CONTRÔLÉ EST **CONFORME** OU NON À SES **SPÉCIFICATIONS** OU EXIGENCES PRÉÉTABLIES PAR LE RÉFÉRENTIEL ET INCLUANT UNE **DÉCISION** D'ACCEPTATION, DE REJET OU DE RETOUCHE.
- LE CONTRÔLE QUALITÉ DES MÉDICAMENTS EST UN ENSEMBLE DE MESURES QUI PERMET DE SAVOIR SI LES MÉDICAMENTS FABRIQUÉS OU VENDUS PAR UNE ENTREPRISE SONT CONFORMES:
  - AUX EXIGENCES DU MARCHÉ,
  - À LA DEMANDE DU CLIENT,
  - AUX LÉGISLATIONS EN VIGUEUR,
  - AU CAHIER DES CHARGES DE L'ENTREPRISE.

# I. INTRODUCTION

La maîtrise de la bio-contamination dans l'industrie pharmaceutique reste une préoccupation constante et s'inscrit dans le contexte général de l'efficacité et de la sécurité des médicaments. Cependant, les missions assignées au contrôle microbiologique sont présentes tout au long de la chaîne de production (Matières premières, environnements, personnel, matériels, process ...) et au niveau du produit fini pour répondre aux exigences réglementaires



Bio-contamination  
of pharmaceutical  
product



## II. Contrôles microbiologiques:

Une analyse microbiologique doit permettre d'identifier et d'isoler un microorganisme spécifique (méthode qualitative) et de quantifier une flore particulière dans un échantillon (méthode quantitative).

Le contrôle microbiologique des médicaments permet de :

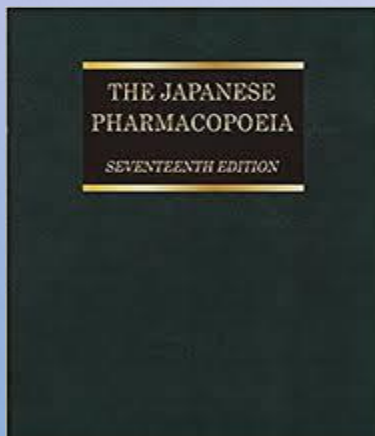
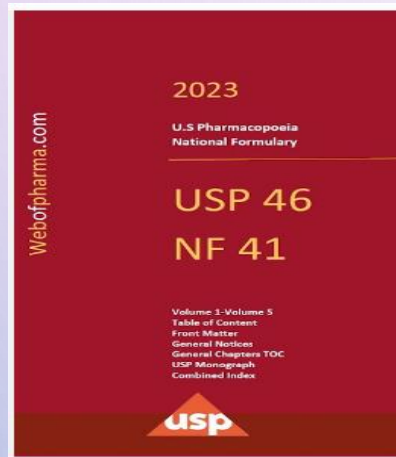
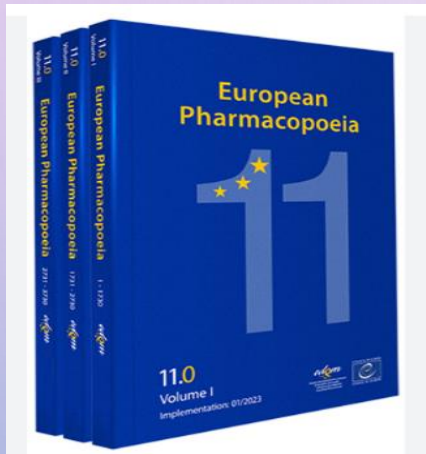
S'assurer que les médicaments sont fabriqués dans un environnement microbiologique satisfaisant et dans le respect de la réglementation en vigueur.



Déterminer la présence quantitative et qualitative de la charge microbienne.

Les produits pharmaceutiques sont analysés selon les directives de **la pharmacopée Européenne, Américaine ou Japonaise.**

Ces trois référentiels sont intégrés dans le système d'harmonisation internationale des normes en matière de contrôle de qualité des médicaments.



EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.0

## 2.6. Biological tests

→ 2.6. Biological tests.....	191	2.6.24. Avian viral vaccines: tests for extraneous agents in seed lots.....	224
→ 2.6.1. Sterility.....	191	2.6.25. Avian live virus vaccines: tests for extraneous agents in batches of finished product.....	227
2.6.2. Mycobacteria.....	194	2.6.26. Test for anti-D antibodies in human immunoglobulin.....	230
→ 2.6.7. Mycoplasmas.....	194	2.6.27. Microbiological examination of cell-based preparations.....	231
2.6.8. Pyrogens.....	199	2.6.30. Monocyte-activation test.....	233
2.6.10. Histamine.....	200	2.6.31. Microbiological examination of herbal medicinal products for oral use and extracts used in their preparation.....	239
2.6.11. Depressor substances.....	200	2.6.33. Residual pertussis toxin.....	241
2.6.12. Microbiological examination of non-sterile products: microbial enumeration tests.....	201	2.6.34. Host-cell protein assays.....	244
→ 2.6.13. Microbiological examination of non-sterile products: test for specified micro-organisms.....	205	2.6.35. Quantification and characterisation of residual host-cell DNA.....	248
2.6.14. Bacterial endotoxins.....	209	2.6.36. Microbiological examination of live biotherapeutic products: tests for enumeration of microbial contaminants.....	250
2.6.15. Prekallikrein activator.....	213	2.6.38. Microbiological examination of live biotherapeutic products: tests for specified micro-organisms.....	255
2.6.16. Tests for extraneous agents in viral vaccines for human use.....	214		
2.6.17. Test for anticomplementary activity of immunoglobulin.....	216		
2.6.18. Test for neurovirulence of live virus vaccines.....	218		
2.6.20. Anti-A and anti-B haemagglutinins.....	218		
2.6.21. Nucleic acid amplification techniques.....	219		
2.6.22. Activated coagulation factors.....	224		

**Les pharmacopées distinguent deux types de produits :**

**Les produits qui  
doivent être  
stériles :**

**Préparations  
parentérales**

**Préparations  
ophtalmiques**

**Fils, pansements  
chirurgicaux,  
Matériel chirurgical**

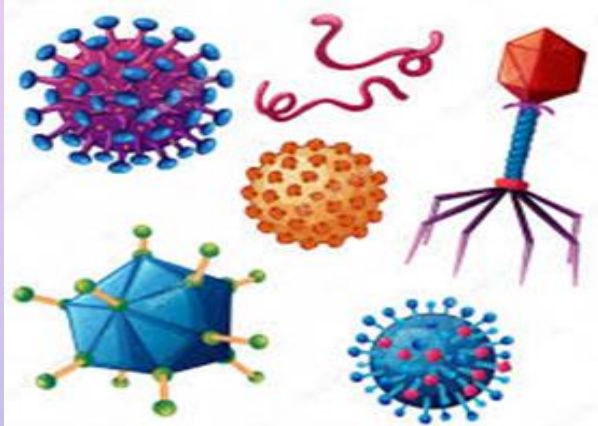
**Les produits non  
obligatoirement  
stériles :**

**Matières  
Premières**

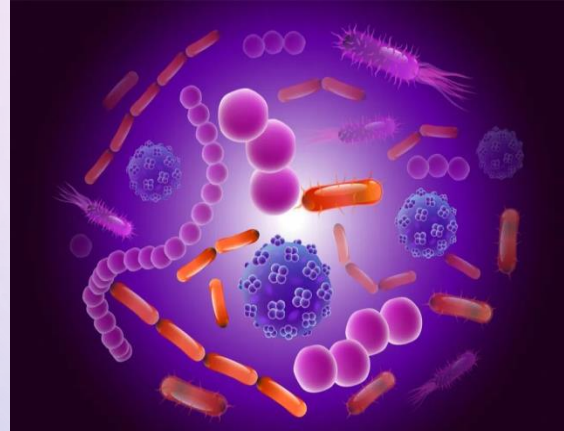
**Les médicaments  
à usage non  
parentéral.**

Les microorganismes peuvent être d'origine :

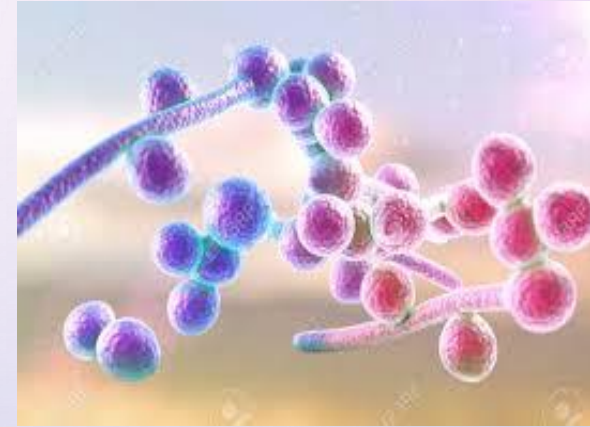
**Virale**



**Bactérienne**



**Fongique**



L'origine de contamination des produits pharmaceutiques :

**L'environnement  
de fabrication  
(surfaces, air et  
matériel)**

**Le  
personnel**

**Matières  
premières  
y compris  
l'eau**

**Conditions  
de stockage**



## Présence de micro-organismes :

**Modification des médicaments**

**Diminuer ou annuler  
l'activité thérapeutique des  
médicaments**

**Constituer un danger  
potentiel pour le patient**

"I DON'T KNOW WHAT THIS IS, BUT YOU SHOULD SEE HOW FAST IT'S GROWING!"



## II. 1) Contrôle des produits stériles :

### A. Essai de stérilité

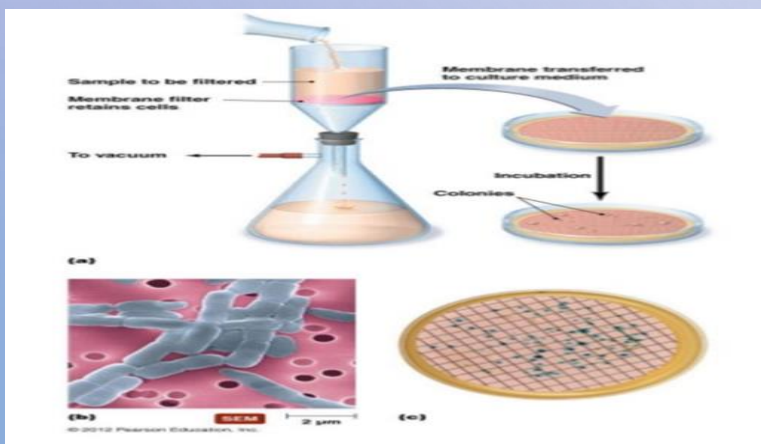
Consiste à vérifier l'absence de tout microorganisme (bactéries, levures et moisissures), avant libération et administration du produit au patient.

Selon le chapitre 2.6.1 de la pharmacopée européenne cet essai

- ❖ S'applique aux substances, préparations, produits qui doivent être stériles selon la Pharmacopée
- ❖ Consiste à vérifier l'absence de microorganismes viables dans un échantillon contrôlé

#### Méthodologie:

##### Filtration sur membrane



#### Deux techniques sont utilisées

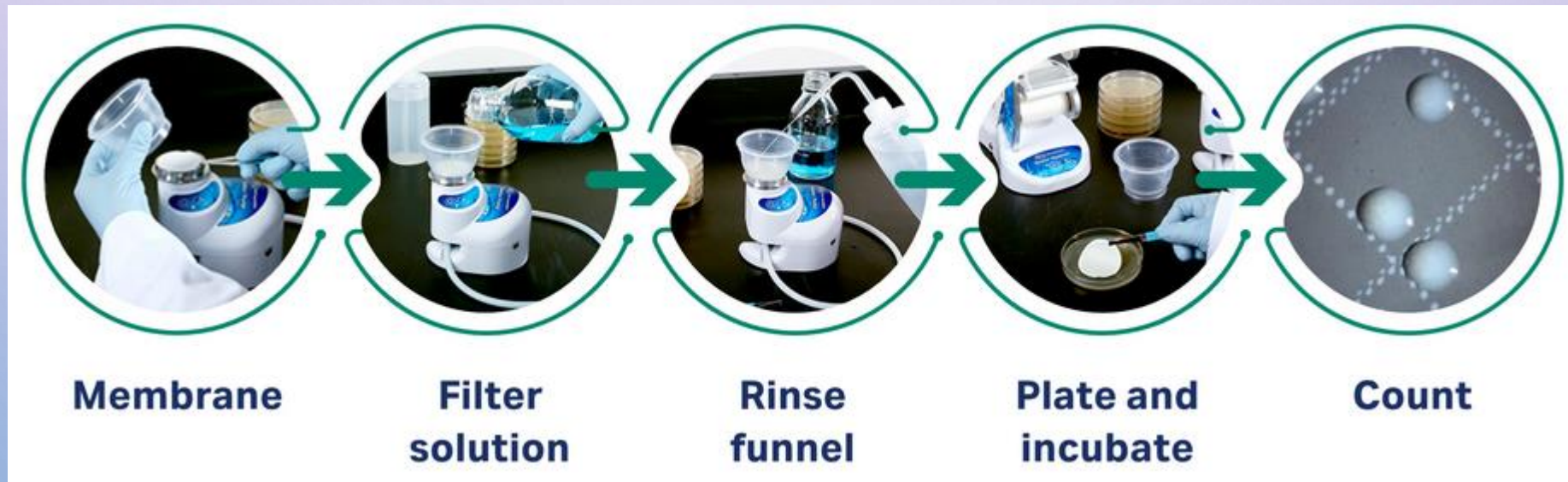
##### Ensemencement direct du milieu de culture



+  
des témoins négatifs  
appropriés.

***A. a. La filtration sur membrane*** : est utilisée pour:

- ❖ Les préparations aqueuses filtrables;
- ❖ Les préparations alcooliques ou huileuses;
- ❖ Les préparations solubles dans des solvants aqueux ou huileux ou miscibles à de tels solvants à condition que ceux-ci n'exercent pas d'effet antimicrobien.



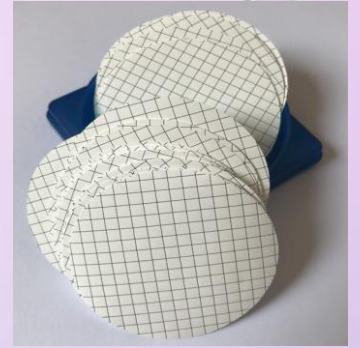
## Matériels:

**Membrane stérile** : de porosité  $\leq 0,45 \mu\text{m}$  et de diamètre d'environ 50 mm.

❖ Membrane de nitrate de cellulose : pour les solutions aqueuses, huileuses ou faiblement alcooliques.

❖ Membrane d'acétate de cellulose : pour les solutions fortement alcooliques.

**Appareil de filtration préalablement stérilisé** : il doit permettre l'introduction et la filtration aseptiques de la solution à examiner. Il doit également être compatible avec un transfert aseptique de la membrane dans le milieu de culture, ou avec une incubation directe dans l'appareil après addition du milieu de culture.



➤ Elle se déroule comme suit pour les « solutions aqueuses » :

1

**Introduire l'échantillon du produit à examiner dans l'entonnoir de l'appareil de filtration (système à vide) : tous les micro-organismes présents dans le prélèvement se concentrent à la surface de la membrane.**

2

**Si nécessaire, rincer la membrane une ou plusieurs fois pour éliminer les substances inhibitrices présentes dans l'échantillon**

3

**Placer le filtre à membrane dans le milieu de culture et incuber à la température appropriée pendant au minimum 14 jours.**

4

**Compter les colonies sous un grossissement 10-15x et identifier le type de contaminant**



Table 2.6.1.-2. – *Minimum quantity to be used for each medium*

Quantity per container	Minimum quantity to be used for each medium unless otherwise justified and authorised
<i>Liquids</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>– less than 1 mL</li> <li>– 1-40 mL</li> <li>– greater than 40 mL and not greater than 100 mL</li> <li>– greater than 100 mL</li> </ul> <i>Antibiotic liquids</i>	The whole contents of each container Half the contents of each container but not less than 1 mL. 20 mL. 10 per cent of the contents of the container but not less than 20 mL. 1 mL.
<i>Insoluble preparations, creams and ointments to be suspended or emulsified</i>	Use the contents of each container to provide not less than 200 mg
<i>Solids</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>– less than 50 mg</li> <li>– 50 mg or more but less than 300 mg</li> <li>– 300 mg to 5 g</li> <li>– greater than 5 g</li> </ul>	The whole contents of each container Half the contents of each container but not less than 50 mg 150 mg 500 mg
<i>Catgut and other surgical sutures for veterinary use</i>	3 sections of a strand (each 30 cm long)

***A. b. Ensemencement direct du milieu de culture :***

**Cette technique est réservée aux produits non filtrables à condition que le volume de produit utilisé ne dépasse pas 10 % du volume du milieu.**

**En inoculation directe, un faible volume d'échantillon est prélevé aseptiquement de l'unité échantillon et inoculé directement dans un volume adéquat de milieu de culture avant incubation.**



***A. c. Milieux de cultures et leurs T° d'incubation:***

**Le milieu liquide au thioglycolate :** recherche des bactéries anaérobies mais également des bactéries aérobies à la T° de 30 à 35°C.

**Le milieu à l'hydrolysate de caséine et de soja :** recherche des levures, moisissures et bactéries aérobies à une T° comprise entre 20 et 25°C.

***A. d. Conditions rigoureuses d'asepsie:*** essai réalisé dans des conditions aseptiques dans des Hottes à flux d'air laminaire ou isolateur.

***A. e. Interprétation des résultats :***

- Absence de signes de croissance microbienne : le produit à examiner satisfait à l'essai.
- Présence d'une croissance microbienne : le produit à examiner ne satisfait pas à l'essai.



## B. Recherche de pyrogènes :

Lorsqu'un médicament est administré par une voie jugée critique comme **la voie intraveineuse**, la préparation doit être dépourvue de **pyrogènes** pouvant engendrer de graves effets secondaires chez le patient.

Les normes de la pharmacopée imposent l'absence de substances pyrogènes dans les produits pharmaceutiques qui entrent en contact avec la circulation sanguine ou le système nerveux central. Les pyrogènes sont définis comme étant des substances pouvant provoquer une brusque élévation de la température. Cette classe de pathogène est variée. Elle regroupe les molécules de nature virale, fongique et bactérienne, dont les endotoxines, constituées du lipopolysaccharides (LPS).

**Les symptômes de pyrogénicité** : Frissons intenses, cyanose, un pouls rapide accompagné de dyspnée, douleurs lombaires.

La recherche des pyrogènes est effectuée sur différents types de produits : **eau, produits intermédiaire et produits finis.**

L'essai consiste à mesurer l'élévation de température provoquée chez le lapin par l'injection intraveineuse d'une solution stérile du produit à examiner. C'est un test in vivo qui permet de chercher tous les pyrogènes

***Sélection des animaux :***

Des groupes de 3 lapins, en bonne santé, mâles ou femelles, de poids corporel supérieur ou égal à 1,5 kg sont utilisés.

nourris suivant un régime complet, équilibré et exempt d'antibiotiques.

Ayant bénéficié du repos requis



## **Déroulement de l'essai :**

**Dépyrogénisation du matériel en verre : 250°C pendant 30min ou 200°C pendant 1h**

**Préparation des lapins :** maintenus individuellement dans un lieu tranquille à une température uniforme et privés de nourriture pendant la nuit précédant l'essai et jusqu'à la fin de celui-ci.

### **Essai préliminaire :**

- **Mettre les lapins dans des boites à contention.**
- **Injecter 10ml /kg d'une solution apyrogène de NaCl à 9 g/l chauffée à 38,0 °C.**
- **Mesurer la température de chaque lapin à partir de 90 min au moins avant l'injection et pendant les 3 h qui suivent l'injection.**
- **Eliminer de l'essai l'animal accusant une variation de température  $> 0,6$  °C.**





### Essai définitif :

- Effectuer l'essai sur un groupe de 3 lapins.
- Préparer l'échantillon à analyser (chauffage à 38,0 °C).
- Injecter lentement la solution dans la veine marginale de l'oreille du lapin.
- Mesurer la T° à partir de 90 min au moins avant l'injection et pendant les 3 h qui suivent.

### Résultats : déterminer

- 1) **La T initiale** : la moyenne de 2 valeurs déterminées à un intervalle de 30 min dans les 40 min précédant l'injection.
- 2) **La T maximale** : la T la plus élevée notée dans les 3 h suivant l'injection.

$$\Delta T = T_{\max} - T_{\text{Initial}}$$

$$\Sigma \Delta T = \Delta T_1 + \Delta T_2 + \Delta T_3 + \dots + \Delta T_{12}$$

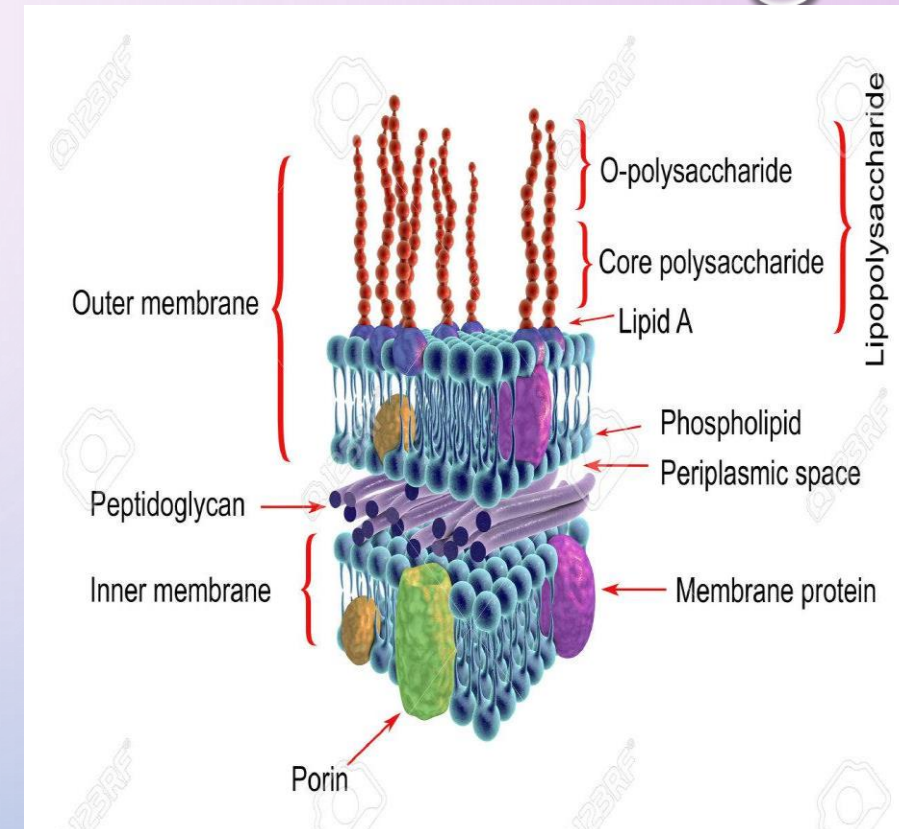


Nombre de lapins	Satisfait à l'essai si $\Sigma\Delta T \leq$ à .....°C	Ne satisfait pas à l'essai si $\Sigma\Delta T \geq$ à .....°C
03	1.15	2.65
06	2.80	4.30
09	4.45	5.65
12	6.60	6.60

- Si pour 3 lapins la somme des écarts de températures se trouve supérieure à **1.15° C** mais inférieure à **2.65° C** il faut refaire l'essai sur 6 lapins .
- Si pour 6 lapins la somme des écarts de températures se trouve supérieur à **2.80° C** mais inférieure à **4.30° C** il faut refaire l'essai avec 9 lapins.
- Si pour 9 lapins la somme des écarts de températures se trouve supérieur à **4.45° C** mais inférieure à **5.65° C** il faut refaire l'essai avec 12 lapins.
- Si pour 12 lapins la somme des écarts de températures se trouve supérieur à **6.60**, le **produit ne satisfait pas à l'essai.**

## C. ESSAI DES ENDOTOXINES BACTÉRIENNES

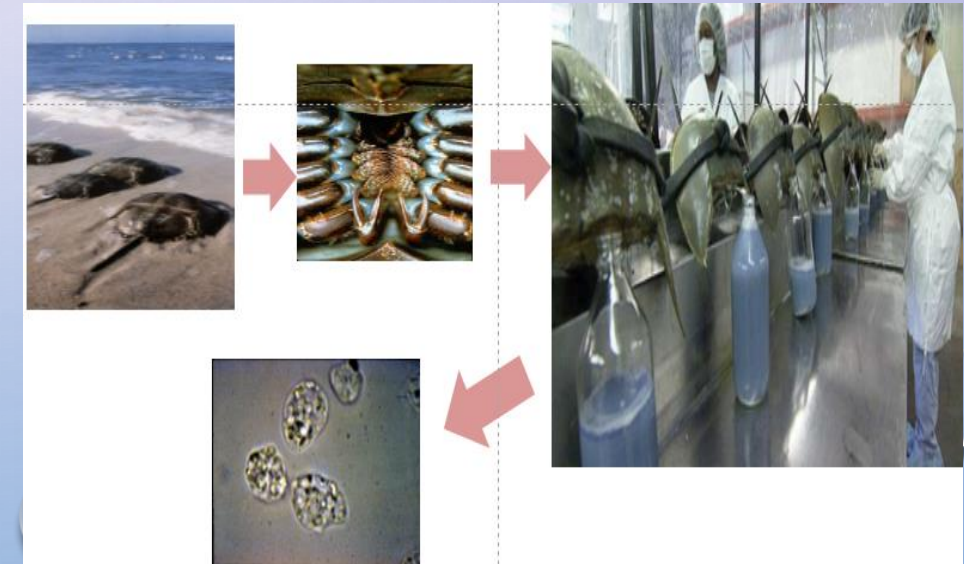
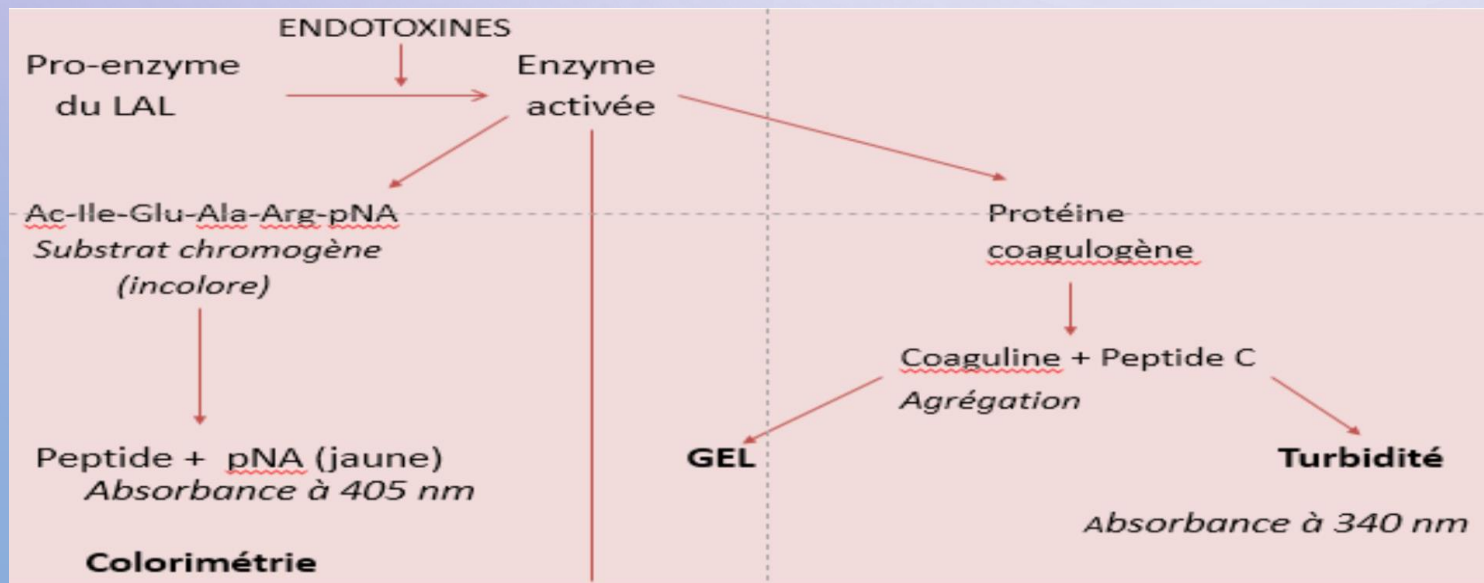
- ❑ Les endotoxines sont retrouvées dans les parois des bactéries Gram négatif de nature lipopolysaccharidique (LPS) (par exemple : *E. coli*, *S. Typhi*, *Haemophilus influenzae*) et chez certaines algues ou plantes supérieures.
- ❑ Les endotoxines sont très résistantes aux procédés de stérilisation employés en routine tels que la stérilisation par la chaleur humide ou la filtration microbiologique.
- ❑ En raison des dangers potentiels des endotoxines pour le patient et de leur résistance aux procédés de stérilisation, leur présence dans les produits pharmaceutiques notamment dans les préparations injectables doit impérativement être contrôlée.

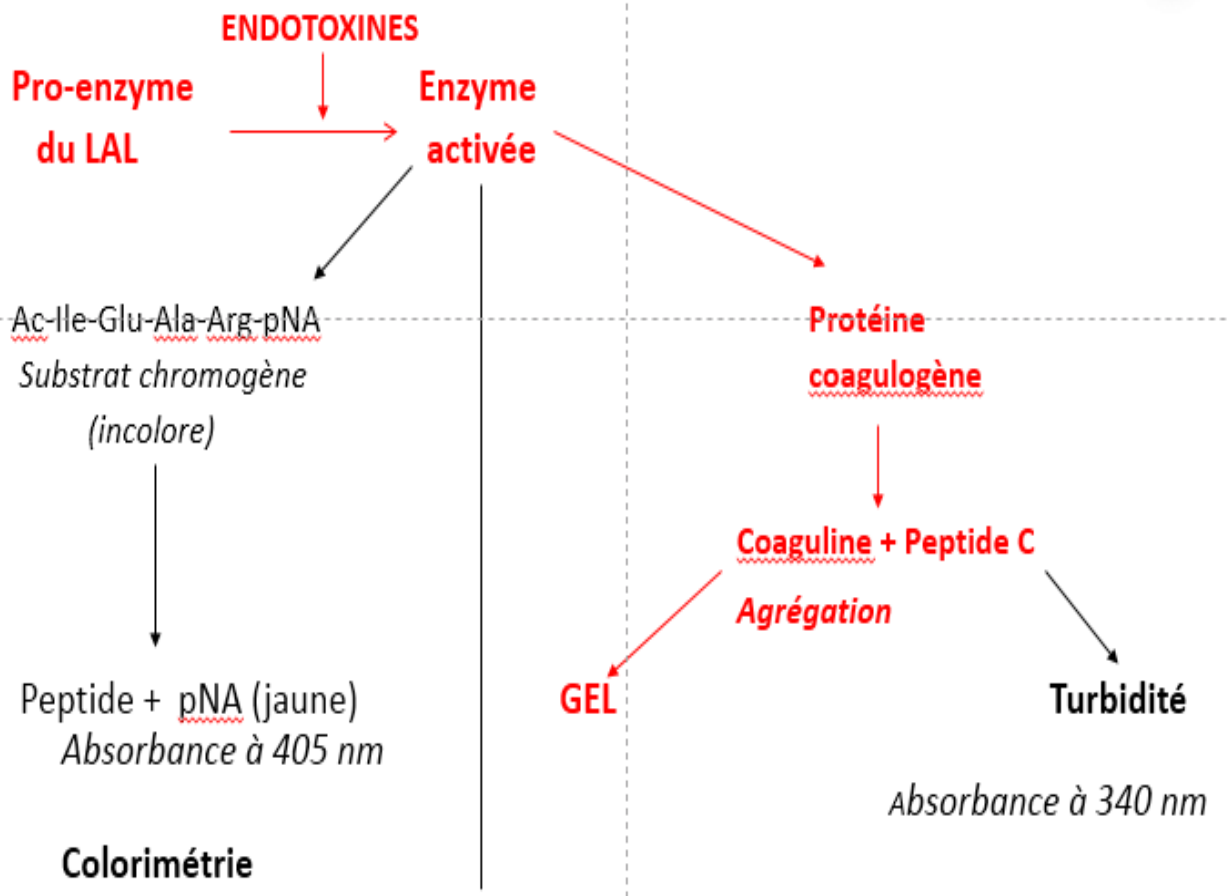


## Le test LAL:

Le dosage des endotoxines se fait par **une réaction enzymatique** réalisée in vitro à l'aide d'un réactif; **le lysat d'améboocytes de limule (LAL)**, obtenu à partir des cellules circulantes du *Limulus polyphemus*. En présence d'endotoxines, un système enzymatique contenu dans le LAL est activé pour obtenir de **la coagulase**, enzyme qui va scinder une protéine, **le coagulogène**, contenue dans le réactif LAL en un gros fragment **la coaguline** et en un petit peptide. C'est la coaguline formée qui est proportionnelle à la concentration en endotoxines et se polymérise pour former un gel.

Dans la monographie 2.6.14 « **l'essai des endotoxines bactériennes** », la Ph. Eur. décrit trois méthodes permettant la détection ou la quantification des endotoxines:





## 1) La méthode de gélification :

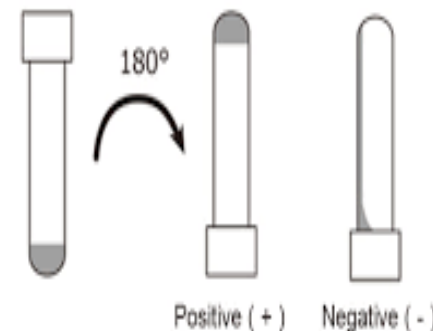
Elle repose sur la propriété que possède le lysat de coaguler en présence d'endotoxines : les molécules de coaguline formées vont s'agréger pour former un gel.

Cette technique consiste à placer des quantités équivalentes de LAL et de solution à tester dans des tubes en verre apyrogène, les mélanger puis les incuber à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant une heure avec les contrôles positif et négatif.

La réaction est positive si un gel solide est obtenu durant l'inversion momentanée du tube réactionnel.

## 2) Technique turbidimétrique :

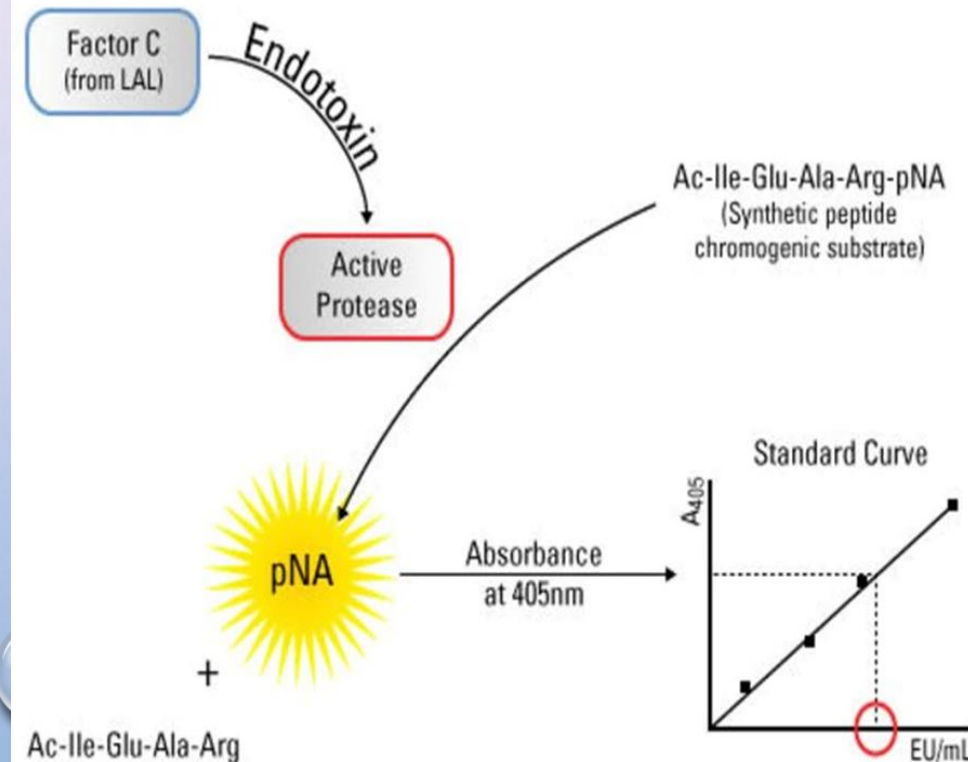
Lors de la mise en présence du LAL et d'endotoxine, la formation de coaguline s'accompagne de l'apparition d'un trouble dont l'accroissement est mesuré par photométrie.





### 3) La méthode chromogénique ou colorimétrique :

Dans cette méthode, la protéine coagulogène peut être éliminée du réactif LAL et remplacée par un substrat chromogène spécifique de la coagulase : le 5-aminoacid-polypeptide (5-pep) lié à la paranitroaniline (pNA). Sous l'action de la coagulase activée, la liaison 5-pep-pNA est coupée, libérant ainsi le pNA qui colore en jaune la solution et qui peut être mesuré par spectrophotométrie (à 405 nm). La vitesse de libération du pNA est fonction de la concentration en endotoxines dans l'échantillon.



## II. 2) Contrôle des produits non stériles :

Cet essai microbiologique permet :

- Le dénombrement de germe indicateur de la qualité globale :
  - ✓ Les germes totaux (DGAT : dénombrement des germes aérobies totaux).
  - ✓ Les levures et moisissures (DMLT : dénombrement des moisissures et levures totales).
- La recherche de microorganismes spécifiques pour quelques produits particuliers :  
*E.coli, Salmonella, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus.*

## Technique :

### *Préparation de l'échantillon avec :*

- Un diluant additionné de neutralisant tamponné pour arrêter l'action des antimicrobiens présents (PA ou conservateur).
- Un tensioactif pour mélanger les produits de nature lipidique.

### *Milieux de culture recommandés par la pharmacopée :*

- Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja pour les germes aérobies totaux.
- Milieu Sabouraud glucosé gélosé + ATB pour les levures et moisissures.

Recherche des microorganismes spécifiques:

- S.aureus : Milieu Baird- Parker
- P. aeruginosa: Milieu Cetrimide
- E.coli : Milieu Mac Conkey
- Salmonella: Milieu SS

### *Examen des échantillons : avec l'une des méthodes suivantes :*

- Filtration sur membrane.
- Dénombrement sur plaque (ensemencement en profondeur ou étalement en surface)

## **Interprétation des résultats :**

**Selon la pharmacopée européenne :**

**DGAT (nombre de germes aérobies totaux) = nombre d'UFC (unité formant colonie) obtenues avec le milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ;**

**DMLT (nombre total de moisissures et levures) = nombre d'UFC obtenues avec le milieu Sabouraud**

**Les critères d'acceptation de la qualité microbiologique, sont interprétés comme suit :**

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

**$10^2$  UFC : nombre maximum acceptable = 200 ;...etc**

**$10^3$  UFC : nombre maximum acceptable = 2000 ;...etc**

<b>Voie d'administration</b>	<b>DGAT UFC/g ou /ml</b>	<b>DMLT UFC/g ou /ml</b>	<b>Micro-organismes spécifiés Absence dans ( )</b>
<b>Orale : préparation non aqueuse</b>	$10^3$	$10^2$	Escherichia coli (1g ou 1ml)
<b>Orale : préparation aqueuse</b>	$10^2$	$10^1$	Escherichia coli (1g ou 1ml)
<b>Rectale</b>	$10^3$	$10^2$	
<b>Buccale, gingivale, cutanée, nasale, auriculaire</b>	$10^2$	$10^1$	Staphylococcus aureus (1g ou 1ml) Pseudomonas aeruginosa (1g ou 1ml)
<b>Vaginale</b>	$10^2$	$10^1$	Staphylococcus aureus (1g ou 1ml) Pseudomonas aeruginosa (1g ou 1ml) Candida albicans (1g ou 1ml)
<b>Transdermique</b>	$10^2$	$10^1$	Staphylococcus aureus (1 dispositif) Pseudomonas aeruginosa (1 dispositif)
<b>Inhalation</b>	$10^2$	$10^1$	Staphylococcus aureus (1g ou 1ml) Pseudomonas aeruginosa (1g ou 1ml) BGN résistantes aux sels biliaires (1g ou 1ml)
<b>Préparation à base de MP naturelle ne pouvant subir de prétraitement antimicrobien</b>	$10^4$	$10^2$	Staphylococcus aureus (1g ou 1ml) Escherichia coli (1g ou 1ml) Salmonella (10g ou 10ml) Au maximum $10^2$ BGN résistantes aux sels biliaires /g ou ml
<b>Aliments médicamenteux vétérinaire ne pouvant subir de prétraitement antimicrobien</b>	$10^5$	$10^4$	Escherichia coli (1g ou 1ml) Salmonella (10g ou 10ml) Au maximum $10^4$ BGN résistantes aux sels biliaires/g ou ml

## II.3) Contrôle microbiologique environnemental :

- Il est réalisé dans le but d'identifier les voies de contaminations possibles afin de mettre en place les actions correctives avant que le produit ne soit contaminé.

### *Contrôle de l'air :*

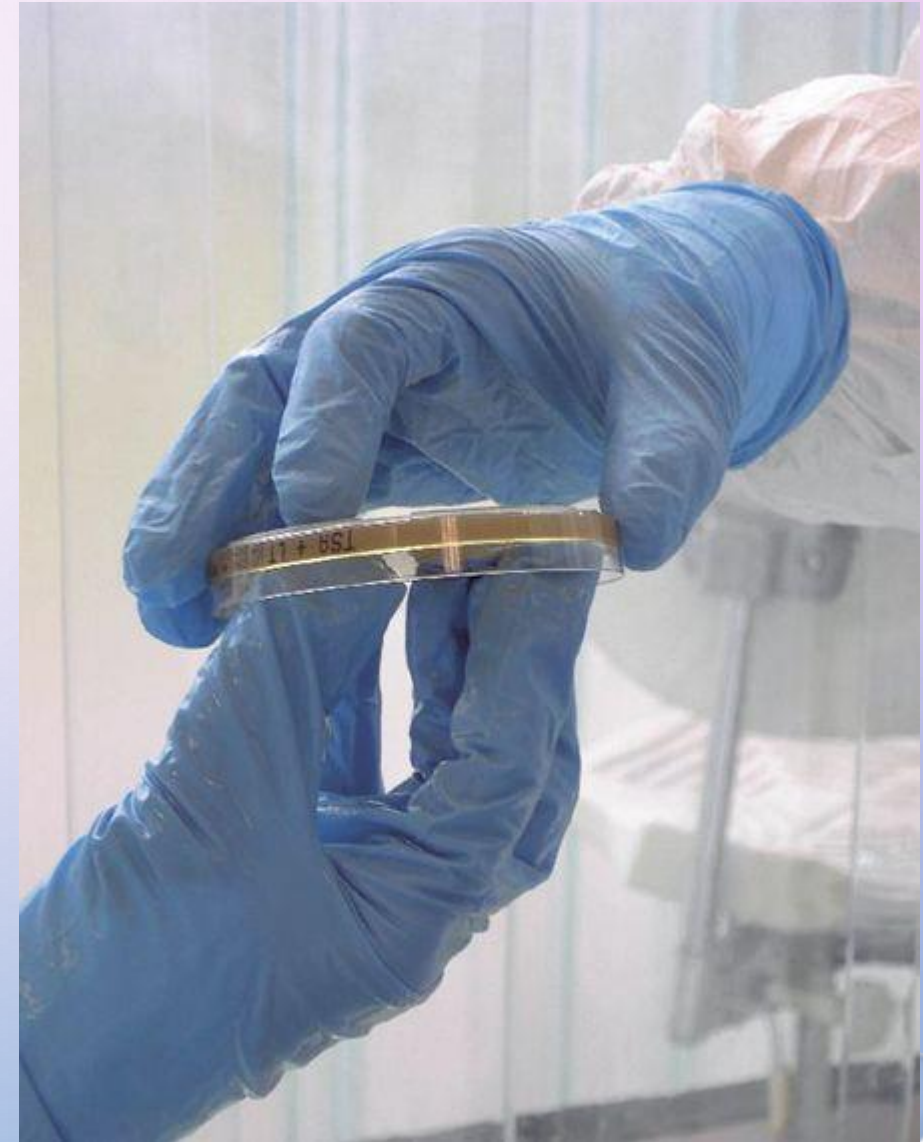
Exposition des boîtes de pétri ouvertes renfermant un milieu de culture standard pendant 4h. Après incubation à 37°C pendant 48h, un dénombrement de particules est effectué.



### **Contrôle du personnel :**

**Estimation de la charge microbienne retrouvée sur les mains gantés des opérateurs en faisant l’empreinte des cinq doigts (pour les deux mains) sur un milieu gélosé nutritif coulé sur une boîte de pétri. Après incubation à 37°C pendant 48h, un dénombrement de particules est effectué.**

Classe	Échantillon d'air UFC/m <sup>3</sup>	Boîte de sédimentation (diamètre 90 mm) UFC/4 heures*	Gélose 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	-



### **Contrôle des locaux :**

**Un écouvillon humidifié, roulé doucement sur la surface à contrôler (25 cm<sup>2</sup>), est utilisé pour réaliser une suspension bactérienne de 5ml.**

- **Un inoculum de 1ml estensemencé dans 2 boites de pétri pour chaque écouvillon.**
- **Les boites sont ensuite incubées à 32°C pendant 5 jours.**





### **III. Autres contrôles biologiques**

Les contrôles de routine, d'enregistrement du produit fini comportent des tests de sécurité qui renferment:

- Essai des pyrogènes;
- Recherche des endotoxines (LAL Test);
- Essai d'innocuité (toxicité anormale) ;
- Tolérance locale (cutanée, oculaire)

### **III. A) Toxicité anormale:**

**Le test de toxicité anormale est aussi appelé test d'innocuité selon la nomenclature de l'OMS.  
Ce test consiste à observer chez la souris, une mortalité après administration d'une dose efficace (non toxique) du médicament à analyser et cela afin de vérifier l'absence d'une toxicité anormale qui serait due à une toxicité surajoutée lors du processus de fabrication et/ou de conditionnement.**

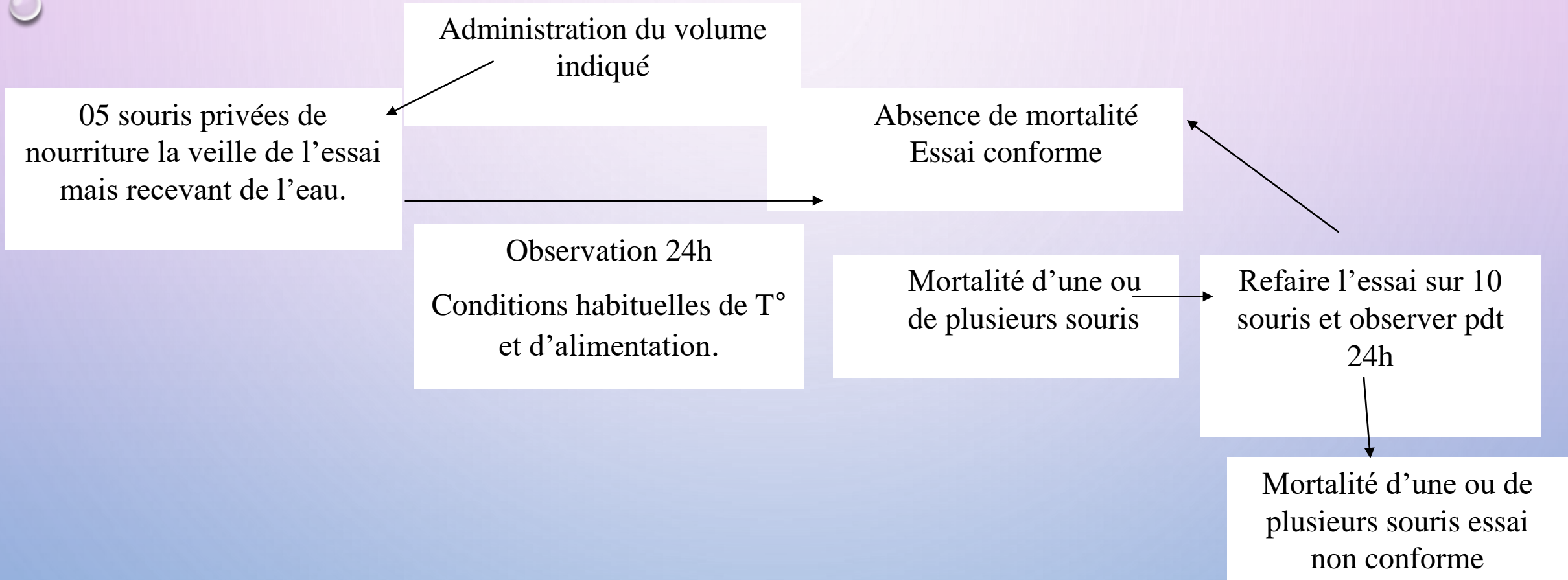
#### **Voies d'administration :**

**Per-os : 1 ml,**

**Parentérale (IP, SC, IV) : 0,5ml**

<b>Voie per-os</b>	<p>Introduire la canule et faire pénétrer la sonde dans l'œsophage</p> <p>Ne jamais forcer les mouvements de déglutition faits par l'animal ; car ils font descendre la canule.</p>
<b>Voie intra péritonéale</b>	<p>Enfoncer l'aiguille en biais (45°).</p> <p>Eviter les mammaires, le foie, la vessie.</p>
<b>Voie sous-cutanée</b>	<p>Introduire l'aiguille sous la peau de la nuque du dos ou du flanc</p> <p>Il faut que l'aiguille glisse librement sous la peau avant l'injection.</p>
<b>Voie intraveineuse</b>	<p>introduire la souris dans une boîte à contention</p> <p>Provoquer une vasodilatation des veines caudales en frottant la queue par un tampon de coton sec ou imbibée d'alcool.</p> <p>Lors de l'injection l'aiguille doit être bien parallèle à la queue</p> <p>Ne pas oublier de chasser les bulles d'air se trouvant dans la seringue et l'aiguille avant toute injection.</p>

**Contrôle de routine :**



- ✓ **Administrer aux souris le produit à analyser en une seule prise.**
- ✓ **3 à 4h après l'administration, remettre sous alimentation en notant exactement le poids afin d'évaluer la consommation des souris par rapport au lot témoin absolu (10 souris).**
- ✓ **Les animaux sont gardés en observation pendant 7 jours et pesés à J0, J2, J7.**
- ✓ **A J0, J2, J7, noter : les troubles observés, la mortalité et l'évolution pondérale comparée entre le lot essai et le lot témoin absolu.**
- ✓ **L'essai est satisfait si aucun des animaux ne meurt durant la période d'observation. Si un animal meurt, l'essai est refait sur un autre groupe d'animaux. L'essai est satisfaisant si aucun des animaux du second groupe ne meurt au cours de la période d'observation, autrement le produit est non conforme.**



### III. B) Tolérance oculaire :

#### But:

Prédire à partir de la connaissance de la toxicité sur l'œil d'un animal vivant, le risque toxicologique chez l'homme.

#### Technique :

L'instillation est effectuée dans le cul- de- sac conjonctival d'un œil chez 6 lapins. L'autre œil non traité sert de témoin. Les paupières sont maintenues fermées pendant 10 sec.



Les lapins sont observés par deux personnes pendant 1h le 1, 2, 3, 4 et 7<sup>ème</sup> jour puis le 14 et 20<sup>ème</sup> jour jusqu'à disparition des lésions. L'évaluation de l'irritation oculaire au niveau de la conjonctive, l'iris et la cornée se fait selon une échelle numérique de 0 à 4.

selon une échelle de 0 a 4 des lésions oculaires

```
graph TD; A[selon une échelle de 0 a 4 des lésions oculaires] --> B[Sur la conjonctive : chémosis, larmoiement et rougissement de la conjonctive]; A --> C[Sur l'iris : réaction a la lumière, hémorragie, congestion]; A --> D[Sur la cornée : degré et étendue de l'opacité];
```

**Sur la conjonctive :**  
chémosis,  
larmoiement et  
rougissement de la  
conjonctive

**Sur l'iris :**  
réaction a la lumière,  
hémorragie, congestion

**Sur la cornée :**  
degré et étendue  
de l'opacité



## ECHELLE NUMERIQUE D'EVALUATION DE L'IRRITATION OCULAIRE

### 1-AU NIVEAU DE LA CONJONCTIVE

#### A- CHEMOSIS

Pas de gonflement	0
Gonflement ,y compris la membrane nictitante	1
Gonflement avec éversion de la paupière	2
Gonflement avec paupière à demi fermées	3
Gonflement avec paupière fermées plus qu'a moitié ou complètement	4

#### B- LARMOIEMENT

Absence ce de larmoiement	0
Larmoiement léger (ne pas tenir compte des légères sécrétions existantes normalement dans l'angle interne )	1
Larmoiement , avec humidification des paupières et des poils avoisinant les paupières	2
Larmoiement , avec humidification des paupières et des poils sur de larges surfaces autour de l'œil	3

#### C- ROUGISSEMENT DE LA CONJONCTIVE PALPEBRALE

Vaisseaux normaux	0
Vaisseaux nettement plus injectés que la normale	1
Vaisseaux difficiles a distinguer individuellement :	
-Couleur rouge vif ,diffuse	2
-Couleur rouge fonce, diffuse	3

### 2-AU NIVEAU DE L'IRIS

Iris normal	0
Iris nettement plus plisse que la normale , congestion, gonflement , iris réagissant encore a la lumière même lentement (une ou plusieurs de ces caractéristiques )	1
Pas de réaction a la lumière , hémorragie , destruction importante(une ou plusieurs de ces caractéristiques )	2

### **3-AU NIVEAU DE LA CORNEE**

#### **A- DEGRES D'OPACIFICATION**

- Aucune modification visible ni perte de brillance ou de poils ..... 0
- Présence de zones translucides (diffuses ou disséminées ), détails de l'iris clairement visibles 1
- Présence de zones translucides facilement identifiables, détails de l'iris légèrement masqués 2
- Présence d'une zone opalescente , aucun détails de l'iris visible , contour de la pupille à peine discernable 3
- Présence d'une opacité cornéenne totale rendant l'iris et la pupille invisibles 4

#### **B- SURFACE D'OPACITE**

- Un quart au moins mais non nulle 1
- Entre le quart et la moitié 2
- Entre la moitié et les trois quarts 3
- Les trois quarts à toute la surface 4

**I.O.I : Indice d'irritation Oculaire individuel qui correspond à la somme des notes obtenues pour chacun des 6 lapins à chaque temps d'observation**

**I.O : Indice d'irritation Oculaire moyen qui est la moyenne des I.O.I des 6 lapins**

**I.O.Max : Indice d'irritation Oculaire Maximum qui est la valeur de l'I.O la plus élevée.**

<b>I.O. Max</b>	<b>Classification</b>
$I.O \text{ Max} < 05$	Non irritant
$05 \leq I.O \text{ Max} < 15$	Très faiblement irritant
$15 \leq I.O \text{ Max} < 25$	Légèrement irritant
$25 \leq I.O \text{ Max} < 50$	Irritant
$50 \leq I.O \text{ Max} < 80$	Très irritant
$I.O \text{ Max} > 80$	Extrêmement irritant

### III. C) Tolérance cutanée :

#### But :

Il s'agit de déterminer la tolérance locale du produit suite à une application unique sur la peau rasée du lapin afin de prédire, à partir de la connaissance de la toxicité sur un organisme vivant, le risque toxicologique chez l'homme.

#### Technique:

Sur la peau rasée de 6 lapins, réaliser 3 incisions de 3cm espacées de 0,5 cm environ au niveau du flanc droit tandis que celui de gauche reste tel quel. Le produit à examiner est déposé puis une gaze ainsi imbibée et recouverte de para-film est appliquée sur les 2 flancs. Apprécier l'érythème et l'œdème selon une échelle numérique et ce après 24h et puis après 72h.



## Résultats:

Le système de cotation des phénomènes observés permet de dégager par un calcul un indice **d'irritation primaire cutanée (IP)** pour classer le produit en 4 catégories :

- A. Non irritant (**IP < 0.5**)
- B. Légèrement irritant (**0.5 < IP < 2**)
- C. Irritant (**2 < IP < 5**)
- D. Très irritant (**5 < IP < 8**)

$$IP = \frac{\sum 24h(E, Oe) + 72h(E, Oe)}{24}$$

<b>Erythème</b>	Pas d'érythème	0
	Léger érythème (à peine visible)	1
	Erythème bien visible	2
	Erythème important	3
	Erythème grave (rouge pourpre) avec ou sans escarres (lésions profondes)	4
<b>Œdème</b>	Pas d'œdème	0
	Très léger œdème (à peine visible)	1
	Léger œdème (conditions bien définies, gonflement apparent)	2
	Œdème moyen (épaisseur d'environ 1 mm)	3
	Œdème grave (épaisseur supérieure à 1 mm)	4



## Références bibliographiques:

- European Pharmacopoeia 10th edition, 2019.
- Sandle, Tim. *Pharmaceutical microbiology: essentials for quality assurance and quality control*. Woodhead Publishing, 2015.
- Roesti David and Marcel Goverde, eds. *Pharmaceutical Microbiological Quality Assurance and Control: Practical Guide for Non-sterile Manufacturing*. John Wiley & Sons, 2019.
- VERJAT-TRANNOY Delphine, et al. "Analyses en microbiologie: Produits stériles." *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation P3354* (2006).