الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université : Dr : Yahia FARES de Médéa

جامعة الدكتور يحيى فارس بالمدية

Faculté des Sciences

Département des Sciences de la nature et de la vie

Projet de fin d'Eudes en vue de l'obtention du diplôme de Master Sciences de la nature et de la vie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Une qualification initiale du test de recherche des endotoxines bactériennes par technique de gélification (Méthode A)

Pour le Chlorure de Sodium (matière première) et Chlorure de Sodium hypertonique à 10% SAIDAL (produit fini)

Présenté par : BOUSSILA Dhikra

Soutenu publiquement le 19 / 09 / 2018 devant le jury composé de :

Président : Mr NASRI Riadh MAA (Université Yahia FARES)

Examinateur : Mr AINAS Mahfoudh MAA (Université Yahia FARES)

Encadreur : Mme BOUHERAMA Amina MAA (Université Yahia FARES)

Encadreur externe : Mme NEGAB IMANE P/ Chef de département –Microbiologie (SAIDAL)

Promotion : 2017 / 2018

Résumé

Dans le cadre de notre étude, nous avons effectué l'évaluation et l'introduction à l'utilisation du test lysat amoebocytes des limules (LAL) par méthode de gélification « gel-caillot » comme un test alternatif, afin de remplacer le test pyrogène de lapin.

L'analyse a été effectuée sur le NaCl utilisé comme étant matière première pour la production des médicaments injectables et le produit fini qui est le NaCl hypertonique à 10% SAIDAL, la présence des endotoxines a été examinée en utilisant simultanément le test LAL et le test pyrogène de lapin.

L'étude *in vivo* « Test pyrogène de lapin », que nous avons mené sur 3 lots de lapins , nous a permis de contrôler si notre produit à analyser contient des substance pyrogène ou non par la mesure de l'élévation de température corporelle des lapins durant 4 heures de mesure. A la fin du test on a pu assurer que notre produit analysé était exempt de substance pyrogène.

L'étude *in vitro* « Test LAL », que nous avons mené sur la base d'une étude qualitative pour la validation du test de recherche spécifique des endotoxines bactériennes, nous a permis de confirmer la sensibilité du lysat(ʎ) envers l'endotoxine « Control Standard Endotoxin (CSE) », aussi bien de chercher les facteurs d'interférences qui peuvent détériorer l'analyse, et de déterminer la sensibilité du lysat en présence et en l'absence de notre produit examiné et que la valeur soit dans l'intervalle [ʎ/2_ 2ʎ] et enfin nous a permis de valider le test LAL par application de l'essai limite.

Mots clés : Endotoxine, Lipopolysaccharide, pyrogène, lysat amoebocyte des Limules, sensibilité, Control Standard Endotoxine, facteur d'interférences.

ملخص:

كجزء من دراستنا أجرينا التقييم ومقدمة حول استخدام اختبار الخلايا المحللة الصباغية للسرطان من خلال طريقه لإخماد "الجلطة الهلامية" كاختبار بديل ، من أجل استبدال اختبار الأرنب المولد للحمى.

واجري التحليل علي كلوريد الصوديوم المستخدم كمادة خام لإنتاج المواد القابلة لا للحقن والمنتجات النهائية ، كلوريد الصوديوم المفرط المنشط بنسبه 10 بالمائة، و قد تم فحص وجود الذيفان الداخلية في نفس الوقت باستخدام كل من اختبار الأرنب المولد للحمى و اختبار الخلايا المحللة الصباغية للسرطان.

في الدراسة الحية " اختبار المولد على الأرنب" ، التي أجريناها علي 3 دفعات من الأرانب ، سمح لنا للسيطرة علي ما إذا كان منتجنا للتحليل يحتوي علي المادة المولدة للحمى أو لا، عن طريق قياس ارتفاع درجه حرارة الجسم من الأرانب خلال 4 ساعات من القياس. في نهاية الاختبار تمكنا من التأكد من أن المنتج الذي حللناه كان خاليا من المادة المولدة للحمى.

في المختبر، قد سمحت لنا دراسة الخلايا المحللة للسرطان ، التي أجريناها علي أساس دراسة شوعيه للتحقق من صحة الفحص الجرثومي البكتيري المحدد، النتائج الملاحظة سمحت لنا بان نؤكد حساسية المحللة λ حساسة و تضبط الذيفان الداخلي باستعمال" الذيفان الداخلي القياسي التحكمي"، كذلك للبحث عن عوامل التداخل التي يمكن أن تضر التحليل وتحديد حساسية من المحللة في وجود وغياب المنتج الذي تمت عليه درست، وان القيمة في هذه الأثناء تكون منسوبة داخل المجال [2λ _ λ/2] وأخيرا يسمح لنا بالتحقق من صحة اختبار بتطبيق اختبار الحد.

كلمات مفتاح : الذيفان الداخلية، عديد السكريات الشحمي، مولد للحمى، الخلايا المحللة الصباغية للسرطان، حساسية المحللة، القيادة القياسية للذيفان الداخلي، عامل التداخل.

Abstract:

As part of our study we conducted the evaluation and introduction to the use of the test lysate amoebocytes of Crabs (LAL) by method of gelling "gel-clot" as an alternative test, in order to replace the Rabbit pyrogenic test.

The analysis was carried out on NaCl used as the raw material for the production of injectable drugs and the finished product which is hypertonic NaCl at 10% Saidal, the presence of endotoxins was examined simultaneously using the LAL test and The Rabbit pyrogenic test.

The *in vivo* study "Rabbit Pyrogenic Test", which we conducted on 3 batches of rabbits, allowed us to control whether our product to be analyzed contains pyrogenic substance or not by measuring the elevation of body temperature of rabbits during 4 hours of measurement. At the end of the test we were able to ensure that our analyzed product was free of pyrogenic substance.

The in vitro "LAL test" study, which we conducted on the basis of a qualitative study for the validation of the specific bacterial endotoxin assay, allowed us to confirm the sensitivity of the lysate (ʎ) to the endotoxin "Control Standard Endotoxin (CSE), also to look for interference factors that can damage the analysis and to determine the sensitivity of the lysate in the presence and absence of our examined product and that the value is in the meantime [ʎ/2 _ 2 ʎ] and finally we Allowed to validate the LAL test by application of the limit test.

Key words: Endotoxin, Lipopolysaccharide, Pyrogenic, crabs amoebocyte lysate, sensitivity, Standard Control endotoxin, interference factor.

Remerciements :

*Par ce mot que les compagnons ouvraient le livre, j'exprime ma reconnaissance totale à **Allah** de m'a avoir donné les forces, la volonté et le courage pour accomplir ce travail modeste et d'avoir éclairé le chemin de la réussite. Au nom d'**Allah** nous commençâmes et à son nom nous avons clôturé*

Je remercie tout d'abord les membres du jury pour l'intérêt qu'ils portent à mon travail.

*Monsieur le président **BENADJI Mohamed Amine** et madame l'examinateur **BOUMEDIENNE Farida**, je vous remercie sincèrement pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce modeste travail et pour le temps que vous consacrez à sa lecture et son évaluation. Je tiens à vous remercier pour avoir accepté d'examiner ces travaux et pour le regard scientifique que vous y apportez.*

Je voudrais remercier grandement mes encadreurs de master :

*Mme : **BOUHERAMA. Amina**, MAB (Université Yahia FARES). Pour son sérieux et ses efforts afin de m'aider, de me conseiller et de m'orienter durant les moments les plus crucials. Son ouverture d'esprit, sa rigueur et sa vision de la recherche scientifique, ont été importants pour moi.Ses compétences scientifiques ont largement contribué à l'évolution de cette étude. Merci de me communiquer votre passion pour la recherche et de m'aider à y croire dans les moments difficiles.*

*Mme **NEGAB. Iman** ; ingénieur, Chef de département-Microbiologie - SAIDAL qui non seulement m'a appris à comprendre et métriser le test mais surtout de me donner la chance et l'opportunité à découvrir cet important chapitre dans le domaine microbiologique. Je vous remercie pour votre énergie, votre envie d'innover, votre investissement dans ce travail, votre disponibilité,*

votre sérieux, et votre sens du devoir qui m'ont énormément marqué. Merci de me communiquer votre passion pour la recherche et de m'aider à y croire dans les moments difficiles.

Mme ***AIT OUAMER. Yasmin*** *qui a été à la disposition pour encourager dans le choix de ce sujet et des efforts fournis pour sa validation auprès de l'Université.*

Je ne cesse de remercier la société ***SAIDAL*** *et ses responsables, qui a bien voulu ouvrir ses portes et qui a mis à ma disposition tous les moyens humains et matériels pour la réalisation de la partie expérimentale de mon travail.*

Je tiens à remercier les responsables et toute l'équipe Association ***A3P Algérie*** *commençant par Mr le directeur :* ***DAOUD Kamel*** *et Mr* ***MALOUFI Tarek****, aussi Mr* ***PUIGMAL. Yann****, Mr* ***AMORTTI Cedric*** *et Mme* ***CURAT. Christine*** *de m'avoir donné l'opportunité de confirmer, rassurer, développer et améliorer nos résultats et faire avancer ce modeste travail.*

Merci aux personnes ayant contribué à mon choix de me lancer corps et âme dans ce modeste travail.

Je n'oublie pas le pilier de cet aboutissement : les proches. Je ne serais jamais arrivée jusqu'ici sans leur soutien ! L'amour et l'amitié sont les fondements de toute vie et de toute réussite. Merci d'être vous et merci d'être là.

Dédicace

Tout d'abord, ***louange à Allah****, seigneur de l'univers ; comme il se doit, pour la majesté de Ta Force et l'immensité de Ton pouvoir.*

J'aimerai bien remercie mon père, pour ses efforts et pour son soutien continu depuis le début de mon parcours scolaires, et l'énergie pour assurer la continuité de mon succès, et surtout de son énergie qui me l'a partagé, merci Papa.

Je n'oublie pas de remercie ma mère, pour ses sacrifices avec le temps et l'énergie pour assurer la continuité de mon succès, l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études, merci Mama.

A mes tantes, oncles.

A mes très chères sœurs, Romaissa et Afrah et mes nièces Manissa et Rana

A tous mes proches, intimes et amis, Romaissa, Iman, Hakima, Rym, chérifa

A la pensée de ma grand –mère et mon frère d'âme Rédha.

Liste des abréviations:

CA : Certificat d'analyse.

CSE : Contrôle Standard Endotoxin.

E. coli : *Escherichia. coli.*

Eau EEB : Eau pour essai des endotoxines bactériennes.

EEB : Essai des endotoxines bactériennes.

FDA : Food Drug Adminitration.

IL-1 : Interleukine 1.

IL-2 : Interleukine 2.

LAL : Lysat d'amoebocytes de limule.

LE : Limite en endotoxines.

M.P : Matière première.

NaCl : Chlorure de sodium .

P.F : Produit fini.

Ph. Eu : Pharmacopée européenne.

RPT : Rabbit pyrogen test.

RSE : Référence Standard Endotoxin.

UI : Unité internationale d'endotoxine.

UE : Unités d'endotoxines.

Sommaire :

Résumé.....

Remerciements .....

Liste des abréviations .....

Table des matières …….....

Introduction …….. 1

Partie I : Rappel bibliographique

Chapitre 1 : Contrôle de qualité des médicaments injectables

I. Introduction..... 2

II. II. Médicaments injectables..... 2

1. Définition..... 2

2. Forme pharmaceutique destinée à la voie parentérale. **3**

III. Contrôles biologiques de routine appliqués aux médicaments injectables..... 3

1. Introduction..... 3

2. Contrôle de qualité des médicaments..... 4

2.1. Stérilisation..... 4

2.2. Apyrogénicité. 4

Chapitre 2 : Endotoxines bactériennes.

I. Introduction..... 6

II. Les endotoxines bactériennes..... 7

1. Définition..... 7

2. Effet des endotoxines bactériennes..... 7

3. Description et localisation des endotoxines bactériennes..... 8

4. Composition d'endotoxine..... 9

5. Activité biologique des endotoxines..... 10

III. Recherche des pyrogènes « endotoxine » dans les produits pharmaceutiques parentérales..... 12

1. Principe..... 12

2. Historique..... 12

3. Essais de détection des endotoxines..... 12

3.1. Test de détection. 12

3.1.1 Test *in vivo.* 13

3.1.2. Test *in vitro*..... 14

4. Raison de l'existence d'un contrôle des endotoxines…….. 16

5. Exigence relatives aux endotoxines dans la pharmacopée Européenne. ……. 17

Chapitre 3 : Test lysat d'amoebocytes de Limules, technique de gélification

I. Introduction ……. 18

II. Définitions..... 18

1. Lysat d'amoebocytes de Limules..... 18
2. Sang des limules..... 19
3. Amoebocytes..... 19

III. Découverte..... 21

IV. Principe..... 21

V. Caractéristiques liées au LAL..... 22

1. Sensibilité du lysat..... 22

2. Facteurs d'interférence de l'essai LAL..... 23

VI. Réactif et préparation de solution de l'essai..... 24

1. Réactifs..... 24
2. Préparation des solutions..... 25

Partie II Matériels et méthodes

Chapitre 1 : matériel

1. Matériel non biologique..... 28

1.1 Matière première..... 28

1.2 Produit fini..... 28

2. Matériel biologique..... 29

Chapitre II : Méthodes

1. Expérimentation *in vivo*..... 30
   - 1.1. Dépyrogénisation du matériel..... 30
   - 1.2. Préparation des solutions à injection. 30
   - 1.3. Conditionnement des animaux « Lapin »..... 30
   - 1.4. Préparation des lots…..... 31
   - 1.5. Enregistrement des températures initiales de Contrôle préliminaire..... 31
   - 1.6. Injection des solutions à analyser. 31
   - 1.7. Enregistrement des températures..... 31
   - 1.8. Expression des résultats..... 32
2. Expérimentation *in vitro*..... 33

2.1. Préparation des solutions. 33

.....
2.1.1 Préparation du contrôle standard endotoxines 33
2.1.2. reconstitution du LAL…….
2.1.3 Détermination des DMS de NaCl..... 34
2.2. Qualification de la sensibilité déclarée du lysat 35
2.2.1. Conformité de la sensibilité du LAL 35
3.2.1. Recherche des facteurs d'interférences..... 36
2.3. Essai limite. 38

Partie III : Résultats et discussion

I. Test pyrogène de lapin *in vivo*..... 40
1. Mesure de température initiale, et contrôle préliminaire..... 40
2. Mesure de température après l'injection 41
II. Test lysat d'amoebocytes des limules (LAL)..... 42
1. Préparation de réalisation de l'essai 42
2. Qualification initiale de l'EEB..... 42
2.1.Qualification de conformité de sensibilité du lysat..... 42
2.2. Essai de recherche des facteurs d'interférences..... 45
2.2.1. Interférences liées au pH..... 49
2.2.2 Interférences liée à la chélation des cations bivalents..... 49
2.2.3. Interférence liée aux activateurs..... 49
3. Essai limite 51

Conclusion : ……. 56
Référence bibliographique.
Annexes.
Liste des figures.
Liste des tableaux.

Introduction

Les endotoxines issues de bactéries à Gram négatif, sont des substances de nature lipopolysaccharidique. Elles sont les principales responsables des effets toxiques attribués à la contamination des produits pharmaceutiques par des pyrogènes (Martino TK, 1998). Leur activité pyrogène est plus élevée que celle de la plupart des autres substances pyrogènes.

L'administration des endotoxines par voie parentérale engendre des réactions fébriles de la fièvre à de faibles doses jusqu'aux chocs septique et même des décès à des doses très forte(Martino TK, 1998).Il n'existe aucun traitement spécifique, on a uniquement des traitements symptomatiques.

Il est souvent justifié d'interpréter l'absence d'endotoxines bactériennes dans les préparations injectables (Solutés, vaccins, perfusions) comme équivalent à l'absence de pyrogène à condition que l'éventualité de la présence de pyrogènes autres que des endotoxines puisse être exclue. (FDA et Ph. Eu, 2017 9.0).

L'essai des endotoxines bactériennes destiné à la détection des endotoxines produites par les bactéries à Gram négatif, sont deux, le test pyrogène de lapins (RPT) ; test *in vivo* traditionnellement utilisé ; et le test lysat d'amoebocytes des Limules test *in vitro,* qui souhaite remplacer le test traditionnel.(BlechovaR et PivodovA D.2001)

Dans le cadre de l'étude d'évaluation etde validation du test de dosage des endotoxines bactériennes par le lysat d'amoebocyte des Limules(test LAL), par technique de gélification pour le NaCl matière première et NaCl hypertonique à 10% SAIDAL comme un test alternatif qui souhaite remplacer le test pyrogène de lapin. , notre étude a été expérimentée par :

Un test :*in vivo* qui se base sur l'élévation de la température corporelle des lapins à essais après l'injection de la solution à examiner NaCl.

Un test *in vitro* basé sur la formation de gel-caillot en présence d'endotoxines bactériennes

Comme indiqué dans l'essai des endotoxines bactériens par méthode LAL, il faut disposer d'information sur :

La conformité de la sensibilité du lysat (réactif LAL, responsable de la détection des endotoxines) afin de confirmer la valeur déclaré par la Pharmacopée Européenne [ʎ/2_2ʎ].Un essai de recherche des interférences qui peuvent détériorer le produit à analyser et enfin une essai limite ou de routine pour la validation du test LAL.

Partie I

Rappel bibliographique

Chapitre 1

Control de qualité biologique des médicaments injectables

I. Introduction :

Les médicaments destinés à la voie parentérale doivent satisfaire de manière très rigoureuse à plusieurs essais dont celui de la stérilité, de contamination particulaire et endotoxines bactériennes en appliquant les concepts d'assurance qualité **(Ph. Eu 9.0. 2017).**

Pour préserver leur qualité, des précautions doivent être prises pour limiter la charge microbienne avant la stérilisation en utilisant des composants comportant un niveau suffisamment faible de contamination microbienne **(Philippe P. 2001)**. Ceci semble suffisant, mais pour assurer une qualité microbiologique souhaitable pour la production de médicaments parentéraux conformes est en vérité incomplet. Pour ces raisons, le contrôle de la contamination microbiologique des produits pharmaceutiques à usage parentéral est évalué en amont, au cours des différentes phases de développement du produit et durant les fabrications ainsi qu'à la fin sur le produit fini **(Mathieu S et *al.*, 1996).** Cela nécessite une série de tests microbiologiques à effectuer pour savoir les différentes origines de contamination accidentelles qui peuvent toucher la santé des patients. Ces tests se concentrent sur le nombre et le type de micro-organismes, sur les impuretés telles que les endotoxines bactériennes. Bon nombre de ces tests sont décrits dans différentes pharmacopées internationales.

La stérilité et l'apyrogénicité, définies comme les absences respectives de micro-organismes variables et de substances pyrogènes, constituent des critères de qualité microbiologique et de sécurité pour l'administration des médicaments ou l'utilisation des dispositifs médicaux chez l'homme **(Akers MJ, 1984).**

II. Médicament injectable

1. Définition

Les médicaments injectables sont constitués de liquide en solution ou en suspension, ou d'émulsion, pouvant être administrés sous forme de piqûre (voie parentérale). Le terme Parentéral veut dire étymologiquement : à coté (para) des intestins ; c'est-à-dire tout ce qui, dans l'organisme, entre par une voie autre que celle des intestins **(Pfeiffer R. 1892).**

2. Forme pharmaceutique destinée à la voie parentérale

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

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

- **Préparations pour perfusions I.V :** Ce sont des solutions aqueuses ou des émulsions en phase aqueuse stériles et apyrogènes. Elles sont destinées à être administrées en grand volume, ce sont les solutés massifs.

- **Poudres pour injection ou perfusion I.V :** Ce sont des substances solides et stériles réparties dans leur récipient définitif, elles forment rapidement une solution ou une suspension après agitation avec le volume prescrit d'un liquide approprié et stérile.

III. Contrôles biologiques de routine appliqués aux médicaments injectables stériles et apyrogènes :

1. Introduction

Le contrôle biologique de routine appliqué pour les médicaments injectables consiste à assurer deux notions : la stérilité et l'apyrogénicité.

La stérilité et l'apyrogénicité, définies comme les absences respectives de micro-organismes viables et de substances pyrogènes, constituent des critères de qualité microbiologique et de sécurité pour l'administration des médicaments ou l'utilisation des dispositifs médicaux chez l'homme. **(Le hir A. 1988).**

Le contrôle de ces paramètres, en termes d'objectif, de conditions opératoires et d'interprétation des résultats, est fixé par les réglementations ou normalisations par pharmacopées européennes et américaines pour les médicaments ; et normes, pour les dispositifs médicaux **(Akers MJ, 1984).**

2. Control de qualité des médicaments

Le contrôle qualité des médicaments est un ensemble de mesure qui permet de savoir si les médicaments fabriqués ou vendus par une entreprise sont conformes ou non à des spécifications et exigences préétablies par le référentiel contrôle qualité des médicaments **(ISO 17025. 2013).**

En microbiologie, pour les préparations pharmaceutiques telles que les solutions parentérales, injectées dans le système sanguin ou sous la peau, les pharmacopées internationales demandent dans un premier cas, une stérilité complète, dans l'objectif du contrôle de stérilité des injectables en vérifiant l'absence de micro-organismes dans un échantillon représentatif d'un lot de médicaments. Puis un essai de recherche des endotoxines bactériennes pour garantir l'apyrogénicité, une propriété indispensable qui empêche la montée de fièvre toujours d'un lot de médicament. **(Weinenbaum G. et *al*., 1971).**

2.1. Stérilisation :

La Stérilisation est un système de mise en œuvre d'un ensemble de méthodes et de moyens visant à éliminer (ou détruire) tous les micro-organismes vivants **(l'ISO 11139:2001. 2.42)** dans le but d'atteindre l'état de stérilité, c'est-à-dire pouvoir garantir avec un risque maîtrisé l'absence de micro-organisme viable.

Différentes méthodes appropriées au terme de stérilisation sont appliquées selon la sensibilité des multiples microorganismes. Dans le premier cas, il est indispensable d'utiliser des méthodes qui ne sont pas susceptibles de gêner la prolifération ultérieure des germes étudiés en utilisant essentiellement des méthodes physiques ; dans le deuxième cas, il sera possible d'utiliser des méthodes plus variées et à effet plus durable (méthodes physiques et chimiques) **(Simonet M et *al*., 1995).**

2.2. Apyrogénicité

Un produit est dit apyrogène lorsqu'il n'engendre pas d'augmentation de température interne chez un animal à sang chaud ou chez l'humain. La stérilisation à l'autoclavage est insuffisante, en ce sens que des bactéries détruites peuvent subsister et larguer des endotoxines **(William K. 2003).**

Les produits apyrogènes sont demandés par les utilisateurs dans différents domaines, en particulier dans la culture de cellules et de tissus. En effet les substances pyrogènes peuvent avoir un effet cytotoxique **(William K. 2003).**

La méthode utilisée pour tester et certifier l'apyrogénicité des produits est le test **(Lysat Amoebocytes des Limules**), un test alternatif du test pyrogène de lapin RPT **(Friberger P. 1987).**

Chapitre 2

Endotoxines bactériennes

I. Introduction

L'endotoxine bactérienne se réfère à des contaminants très répondus et très puissants dans l'environnement tel que les lipopolysaccharides trouvés à la face externe des bactéries à Gram négatif **(keithEsch R et *al*., 2010).** Elle diffuse dans des milieux où la présence de telles bactéries est favorisée, comme les réservoirs d'eau impliqués dans le processus de fabrication des produits pharmaceutiques et les médicaments à usage parentéral **(Thyssen M et *al*. 2003).**

Pyrogène, est une substance qui génère de la fièvre. L'endotoxine est définie comme une principale substance pyrogène. D'origine, les pyrogènes sont nombreuses est de point de vu de leur nature, elles sont soit endogènes comme les cytokines (interleukin-1 et interleukin-2) ou soit des pyrogènes exogènes qui sont les plus importants dans le domaine pharmaceutique.

Les pyrogènes exogènes induisant une fièvre sont principalement et majoritairement produites par les bactéries à Gram négatif et font partie de l'endotoxine. C'est le lipide A, une partie endotoxinique du LPS **(Rietschel et *al*., 1993).** En tant que puissant immunostimulant, l'endotoxine peut activer une variété des cellules immunitaires des mammifères à la fois dans le corps, en particulier le système circulatoire déclenche une sécrétion excessive d'une large gamme de cytokines. Cela peut entraîner une défaillance multiple des organes ou choc septique et même la mortalité chez les patients. Contamination par l'endotoxine est un problème important dans le monde entier qui affecte des centaines de milliers de patients chaque année (**Li Y et BoraschiD. 2016)**. De plus, l'endotoxine est extrêmement stable et peut supporter l'extrême pH, haute température et même autoclave. La détection précise et le contrôle strict de l'endotoxine est donc une étape critique dans la fabrication et le contrôle de la qualité des produits médicaux **(Das A et Pet Kumar PS. 2014).**

Dans l'assurance qualité des produit médicaux à usage parentéral, des tests de stérilité sont indispensables, il est crucial d'éviter la présence des pyrogènes. L'endotoxine peut être mesurée principalement par deux méthodes: le RPT et test LAL **(Pardo-Ruiz Z et *al*., 2016).** Le RPT est basé sur le fait que la présence d'endotoxine induit une température corporelle élevée chez les lapins et la limite de détection est de 0,5 UE/ml (1 UE = 1 unité d'endotoxine).

Le test LAL, basé sur le fait que les extraits protéiques du crabe à cheval *Limulus. Polyphemus,* peuvent coaguler en contact avec l'endotoxine même avec une quantité inferieure à 0.5 UE/mL **(Blechova et Pivodova. 2001).** Ce dernier est effectué dans trois différents formats, y compris le dosage gel-caillot « méthode de gélification », technique

colorimétrique et technique turbidimétrique. L'essai de gel-caillot, est la méthode référentielle la plus commune **(Bang et Levin. 1956).**

II. les endotoxines bactériennes

1. Définition

Le mot endotoxine se compose du préfixe grec «Endo», qui signifie à l'intérieur, et du mot « toxine » signifiant substance qui confère son pouvoir pathogène toxique **(Richard Pfeiffer. 1892).** Les endotoxines sont des complexes macromoléculaires toxiques intégrales de manière constitutive dans la membrane externe de toutes bactéries à Gram négatif. Elles sont de nature lipopolysaccharidique, sont thermostables ou thermorésistantes **(Brown TM et *al.*,1983)**. Elles ne peuvent être sécrétées à l'extérieur des bactéries qu'après une lyse bactérienne.

La lyse est un processus de destruction de bactérie à Gram négatif provoquée par l'éclatement de la membrane plasmique **(Richard Pfeiffer et Koch. 1892).**

2. Effets des endotoxines

Les bactéries à Gram négatif abritent une quantité d'endotoxine dans leur environnement, alors qu'elles sont en croissance active et en grande quantité lors de la lyse ou la multiplication bactérienne **(Johnson J et *al*., 2006).**

Aucune autre substance pyrogène naturelle connue n'induit une aussi grande diversité d'effets cellulaires et physiologiques, affectant presque toutes les fonctions majeures de l'organisme, allant de la simple fièvre à un état de choc souvent mortel. L'incidence des pathologies associées est en constante augmentation **(Rietschel. 1991).**

Lorsque les endotoxines parviennent à atteindre la circulation sanguine avec une forte dose, en général supérieure de 5UE/mL (Limite en endotoxine acceptée par le corps humains) **(FDA)**, elles peuvent déclencher des réponses qui fragilisent le système immunitaire du corps et altèrent leur performance **(Brade H. 1992)**, elles peuvent également occasionner une réponse inflammatoire générale démesurée, ou syndrome de réponse inflammatoire systémique, pouvant entraîner une fièvre accompagnée de frisson ou un choque toxique et même une insuffisance circulatoire qui tue en déréglant les organes morts **(Raetz RJ et al., 2009).**

Paradoxalement ces mêmes endotoxines renforcent la défense naturelle de l'organisme contre les infections bactériennes et les infections virales lorsqu'elles sont présentes dans la circulation sanguine avec une faible dose inferieure à 5UE/mL **(Cooper J. 1991).**

3. Description et localisation des endotoxines bactériennes

La structure des endotoxines, est un complexe « Protéino- Phospholipido-lipopolysaccharidique ». Il est formé de 5 à 10% de protéines, de 15 à 25% de phospholipides et de50 à 70% de lipide. L'endotoxine bactérienne est une composante intégrale de la membrane cellulaire externe des bactéries à Gram négatif **(André B. 1940)**

La structure fondamentale de la membrane cellulaire des bactéries à Gram à négatif **(Figure 01)** est identique pour toutes les espèces **(David. C, 1992).** Elle se compose d'une membrane externe complexe et double, organisée de façon asymétrique, contenant des LPS identifiés dans toutes les bactéries Gram négatives et responsables d'une partie de l'activité biologique ; une membrane cytoplasmique interne qui sert de barrière osmotique, constituée de protéines et de phospholipides et une fine couche de peptidoglycane que l'on retrouve intercalée entre les deux membrane et qui a pour rôle de maintenir l'intégrité de la structure et de la forme caractéristique de la bactérie.

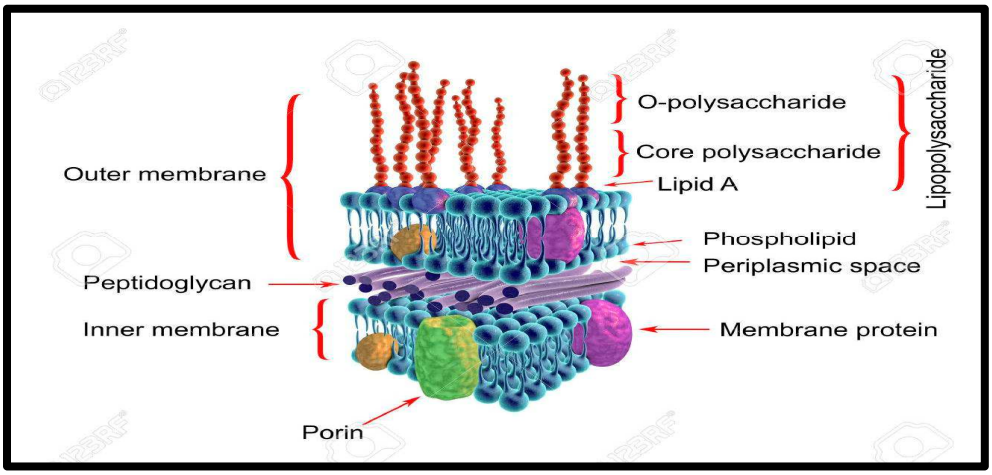


Figure 01 : Structure fondamentale de la membrane cellulaire des bactéries à Gram negatif (Molucular biochemisrty and cellulair biology).

.4. Composition d'endotoxine

Les endotoxines sont constituées d'un ensemble de fragments ancrés dans la membrane externe de la paroi des bactéries à Gram négatif. La région externe représente un polysaccharide, c'est un ensemble de polymères constitué de plusieurs oses liés par des liaisons osidiques. La région interne, représente un lipide essentiel interne intégral de la membrane externe des bactéries de la même classe, d'où vient l'origine d'endotoxine **(Christian R H. 2009).** Du fait que la partie lipidique de LPS est intégrée dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif, les endotoxines sont connues comme LPS Layer **(Rietschel et *al*., 1996).**

Les endotoxines sont donc formées de trois régions : La chaîne O-spécifique, le cœur et le lipide A.

La chaine-O spécifique : La chaine-O spécifique est l'antigène principale de surface constituée d'un polymère de molécules d'oligosaccharides identiques, qui sont appelées unités répétitives **(Williams k. 2003).**Jusqu'à 50 unités peuvent se répéter pour former la chaîne-O spécifique. La nature, le type de lien, la structure ainsi que la séquence dans une unité répétitive sont des caractéristiques d'un lipopolysaccharide donné et sont uniques pour un sérotype bactérien **(Westphal et Lüderitz, 1991)**. La chaîne-O spécifique est la région qui représente la plus grande variabilité des LPS **(Johnson A et *al.*, 1989).**

Le cœur : La région du cœur est constituée d'hétéropolysaccharides, Elle se divise en deux parties : le cœur interne et le cœur externe. La variabilité structurale du cœur est limitée d'où les différences structurales se rencontrent principalement dans la région externe. Tandis que la région interne a une structure bien conservée. Le cœur est lié de façon covalente au lipide A et à la chaine latérale de l'antigène O **(Euzéby JP. 2000).**

Le lipide A : est un constituant lipidique d'une endotoxine responsable de la toxicité des bactéries à Gram négatif **(Williams k. 2003).** Il forme la partie la plus interne des trois régions de la molécule de lipopolysaccharide (LPS Layer ou endotoxine), et sa nature hydrophobe lui permet d'ancrer la partie polysaccharidique dans la membrane externe par des liaisons covalentes **(Witfield C. 2002).** Bien que ses effets toxiques puissent être particulièrement néfaste, la détection de lipide A par le système immunitaire humain peut s'avérer déterminante pour la réponse immunitaire aux infections à Gram négatif **(Carlson RW et *al*., 2002).**

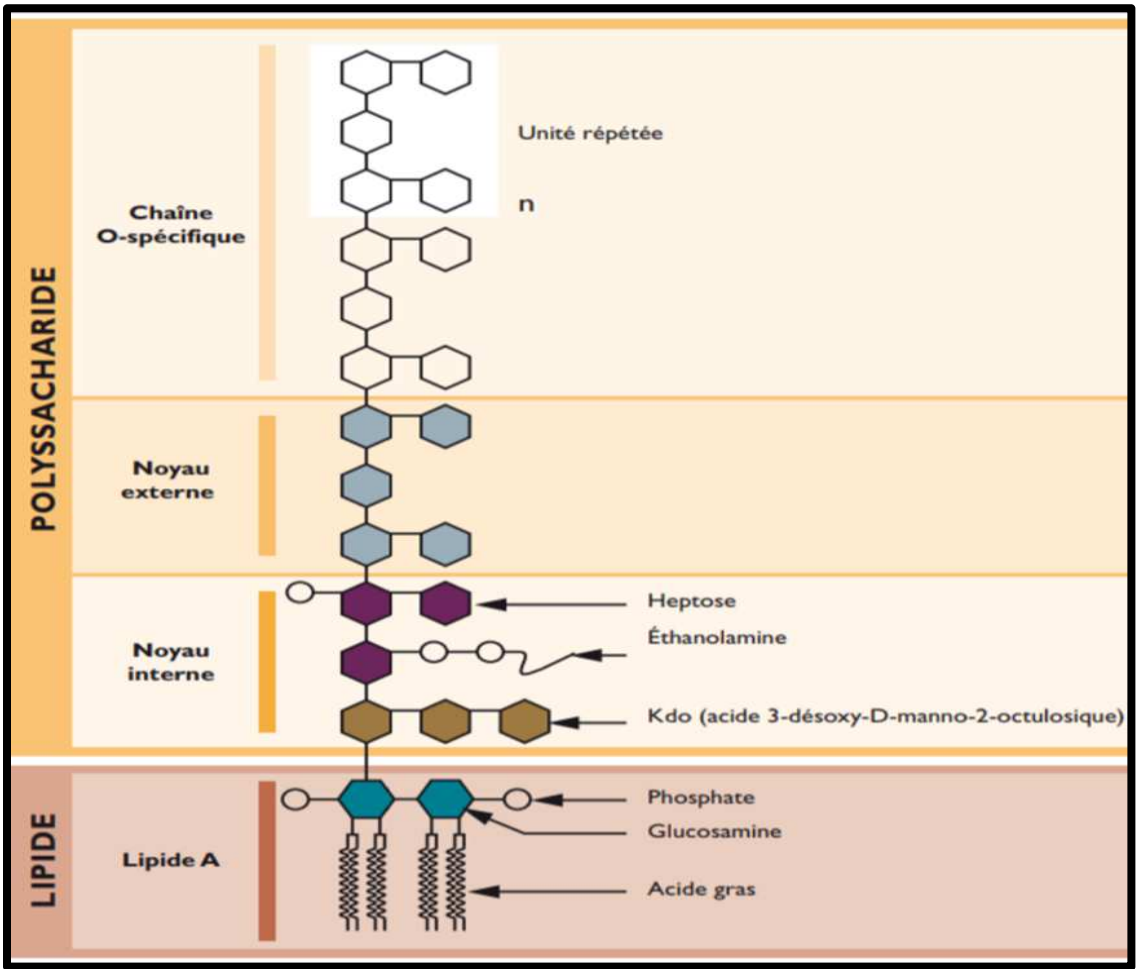


Figure 02 : Structure fondamentale et composition chimique d'endotoxine Bactérienne (Molucular biochemisrty and cellulair biology).

5. Activité biologique des endotoxines

Les endotoxines secrétées, ont plusieurs activités biologiques ; la pyrogénicité et la toxicité en sont des exemples **(Reatz RJ.1991).**La chaine-O spécifique du LPS est l'antigène reconnu de façon spécifique par le système immunitaire lors d'une infection **(Westphal O et *al.*, 1996)**, il contribue donc à une pathogénie potentielle, bien que ce soit le composant lipidique (Lipide A) qui détermine la pathogénicité, propriété endotoxique du LPS **(Galanos C et *al.*, 1984).**

Sur le plan immunologique ; le polysaccharide attaché au LPS constitue l'antigène O responsable de l'activité antigénique. Ce dernier déclenche une réaction immunitaire en faisant produire par l'organisme infecté des anticorps que le reconnaissent spécifiquement **(Luederitz O. 1961).**

La chaine latérale d'antigène O peut également changer rapidement pour échapper à la détection par le système immunitaire.

Sur le plan physiopathologique, le LPS, extrêmement toxique, représente le lipide A comme le principe A comme un principe actif responsable du pouvoir toxique. de l'endotoxine **(Rylander R et *al.*, 1987).**

Dans certaines infections graves, les bactéries ou elles se multiplient, l'endotoxine ou LPS libéré peuvent passer dans la circulation sanguine se lient par l'intermédiaire du lipide A aux protéines cellulaires spécifique de macrophage et polynucléaire neutrophiles **(Euzéby J. 2000)**

En outre, lorsque des cellules bactériennes sont lysées par réaction du système immunitaire, des fragments des membranes contenant le lipide A sont libérées dans la circulation sanguine, engendrant une toxicité néfaste **(Galanos C. 1984)** qui peut provoquer, de la fièvre tout en stimulant les macrophages à élever de plus en plus la sécrétion « des IL-1, IL-6, cytokines…etc. ».Ces substances transportées par le sang augmentent et accumulent la construction des prostaglandines, agissant à leur tour sur les neurones de l'hypothalamus antérieur responsable du règlement de température interne de l'organisme à un niveau plus élevé **(Coceani F., 1991).**Il provoque aussi des diarrhées et parfois une hypotension due à une vasodilatation des vaisseaux sanguins et une hypoglycémie sévère qui peut mener à un choc endotoxique mortel (également appelé choc septique)**(Martino TK, 1998).**Lors d'une infection grave et sévère, l'endotoxine s'accumule dans le sang et stimule les macrophages de tout l'organisme en augmentant le nombre et le genre des cellules immunitaires. L'hypersécrétion de médiateurs provoque alors un choc toxique mortel : le sang cesse de circuler, et toutes les cellules de l'organisme meurent asphyxiées **(Abraham PR. 2001).**

Les endotoxines manifestent soit une activité immédiate telle la fièvre, l'hypotension ou une diminution du compte leucocytaire, soit une activité plus retardée comme l'induction d'anticorps aux LPS **(Abraham PR. 2001).**

III. Recherche des pyrogènes « endotoxine » dans le produit pharmaceutique à usage parentéral

1. Principe

La recherche des pyrogènes, substances induisant une fièvre, détermine souvent la présence des toxines bactériennes « endotoxine » dans les médicaments injectables. La détection de ces substances repose sur deux méthodes d'analyses, une mesure de l'élévation de température corporelles du lapin et/ou recherche directe des endotoxines bactérienne par le test LAL **(Ph. Eu, 2017 9.0).**

2. Historique

Le terme pyrogène a été utilisé pour la première fois en 1875 par le professeur BURDN SANDERSON pour décrire une substance qui provoquait la fièvre. En 1928, F. SEIBERT donne à ces substances hyperthérmistantes le nom de pyrogènes. Actuellement, on désigne sous le nom de pyrogène, les substances responsables des réactions fébriles observées.

3. Essai de détection des endotoxines bactériennes

La détection d'endotoxine, témoigne la présence antérieure de bactéries. Les endotoxines sont toxiques par voie injectables dans le sang à l'état de trace et responsables des chocs fiévreux **(Greef Mirguet G. 2002)**. Une injection d'endotoxines d'une dose à partir de 5UE/mL ou UI/Kg/h de poids corporel (environ 0.5ng d'endotoxine purifiée) dans la circulation sanguine provoque des maux de tête, hypotension, coagulation intra vasculaire disséminée et choc pouvant aboutir à la mort.**(Lanvin G. 2002).**

3.1. Les tests de détection

Les tests les plus utilisés et cités par les pharmacopées internationales afin de détecter la présence des endotoxines sont :

● Un essai *in vivo* qui consiste à la recherche d'un effet pyrogène chez le lapin (RPT).

● Un essai *in vitro*. Test LAL.

3.1.1. Test *in vivo*

- **Principe**

Le test pyrogène de lapin ou le test *in-vivo* RPT, est une méthode traditionnelle qui a été mise en place dans les années 1940 sur les lapins, car ils ont une tolérance pyrogène similaire à celle des humains**(SEIBERT F.1928).**Il s'agit d'une détection qualitative des pyrogènes et qui consiste à mesurer l'élévation de température corporelle du lapin provoquée par l'injection intraveineuse d'une solution stérile du produit à examiner dans la veine marginale de l'oreille après une sélection suivie de l'injection préliminaire. Cette méthode permet de détecter les pyrogènes exogènes non bactériens et bactérien telle que l'endotoxine bactérienne **(SEIBERT F.1928).**

La réponse immunitaire des lapins, lors d'une infection par des substances pyrogènes, se traduit par une augmentation du nombre de cellules leucocytaires, macrophages ou/et autres..Les cellules réagissant à l'action pyrogène secrètent des médiateurs cellulaires tels que « Cytokines, IL-1, IL-6, prostaglandine E^2 …etc. ». Ces médiateurs portent également le nom de substances pyrogènes endogènes lorsqu'ils sont sécrétés excessivement après l'infection, induisant à son rôle à une augmentation de la construction de prostaglandine pour déstabiliser l'hypothalamus de régler la température corporelle **(Coceani F., 1991).**

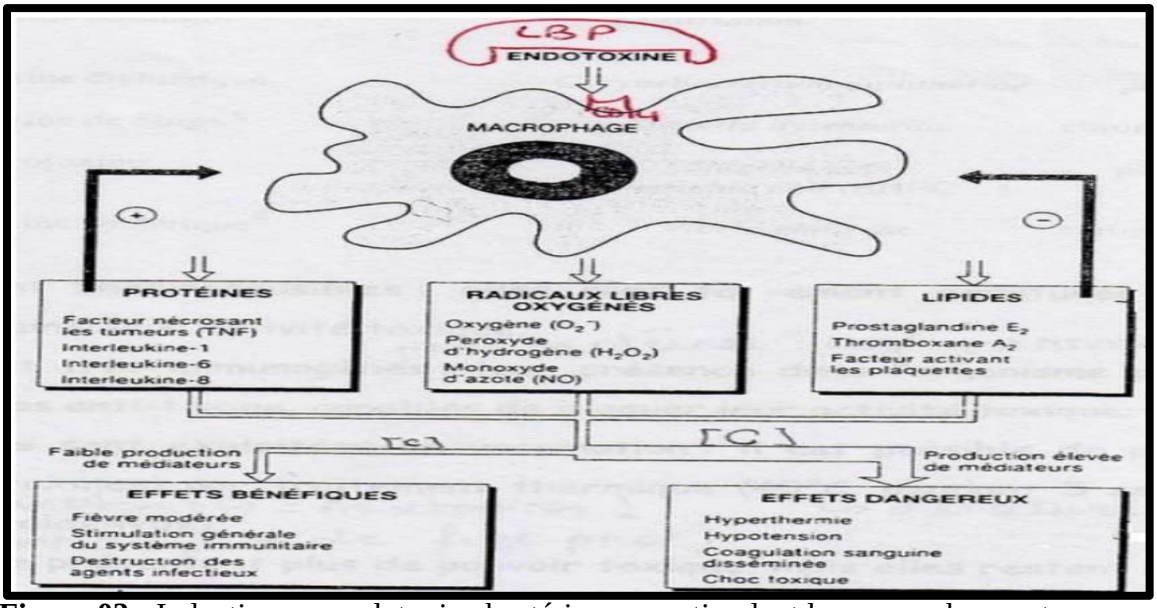


Figure 03 : Induction par endotoxine bactérienne en stimulant les macrophages et les médiateurs cellulaires contre l'infection (CRH. RAETZ, 1991).

- **Champ d'application**

Le test *in-vivo* des pyrogènes ne peut être appliqué que sur les produits ayant une monographie à la Pharmacopée Européenne ou autres. Il est recommandé officiellement pour :

◙ Préparation injectable pour perfusion.

◙ Préparation à diluer pour usage parentéral.

◙ Préparation injectable ou les poudres pour usage parentéral lorsque le volume de la préparation à injecter est égal ou supérieure à 15 mL ou lorsque l'étiquette porte la mention« apyrogène ».

◙ Seringue en plastique à usage unique.

Il est aussi recommandé lorsque le test LAL (Lysat amoebocytes de limules) : test *in vitro* ne peut pas être utilisé, pour :

◙ Solutions pour hémodialyse, hémofiltration et dialyse péritonéale.

◙ L'eau pour dilution des solutions concentrées pour hémodialyse **(Bommer J et *al*., 2006).**

3.2.1. Test in vitro

- **Principe**

Le test *in vitro* ou test LAL, a été découvert en 1955par LEUVIN et BANG. Le dosage des endotoxines bactériennes se fait par une réaction enzymatique réalisée à l'aide d'un réactif lyophilisé, le lysat d'amoebocyte de limule **(Bang et *al.*,1956).**

Le principe de la coagulation du sang du limule **(Howell 1885)** se traduit par la réaction enzymatique des endotoxines bactériennes issues de bactéries à Gram négatif avec les amoebocytes (Globule blanc du sang des limules ou Crabe « en fer à cheval ».

Le principe de la réaction enzymatique des endotoxines avec les amoebocytes (Globule blanc du sang des limules ou Crabe « en fer à cheval »), se traduit par le fait que la concentration des endotoxines catalyse l'activation d'un ensemble d'enzymes responsable de la coagulation du lysat **(Bang et *al.*,1956).** Ce test peut être réalisé à l'aide de 3 différentes techniques :

◙Gélification :

La technique de gélification se fait avec deux méthodes « A et B » reposant sur la propriété que possède le lysat, d'entrainer la formation de gel solide lorsqu'il est mélangé avec une solution contenant des endotoxines bactériennes. La méthode A est la méthode qualitative basé uniquement sur la détection des endotoxines par contre la méthode B est une méthode semi- quantitative. Leur application exige deux contrôles préalables : confirmation de la sensibilité du lysat **λ** spécifié par le fabriquant, comme décrit sous « sensibilité du lysat », et recherche d'éventuels facteurs d'interférences comme décrit sous « Contrôle préliminaire ».

L'objectif de la méthode A utilisée est de vérifier si la préparation des solutions à examiner possède une teneur en endotoxine supérieure à la concentration limite en endotoxine spécifiée dans la monographie concernée **(Ph. Eu 9.0. 2017).**

Cette méthode repose sur la propriété que le LAL coagule à une concentration très faible d'endotoxines. Des quantités équivalentes de LAL et de solution à tester sont introduites dans des tubes à essai en verre apyrogène, mélangées puis mises en incubation À 37°C pendant une heure. A la fin de l'incubation, les tubes sont retournés à 180°, si le gel formé et ferme et reste en place lors d'inversion, la réaction est positive. Ce test permet, après avoir déterminé la sensibilité du LAL d'évaluer la concentration minimale d'endotoxine produisant la coagulation du LAL.

◙Turbidimétrie :

Ce test repose sur le principe que le précédent. La turbidimétrie d'un liquide augmente quand il coagule. Le LAL est dilué de sorte qu'il n'y ait pas de coagulation possible. Quand les endotoxines sont ajoutées au LAL dilué, la solution flocule et sa turbidité est fonction de la concentration en endotoxines. Une courbe d'étalon est réalisée à l'aide de dilution successive d'une endotoxine de référence, cette courbe permettant de déterminer la concentration en endotoxines dans un échantillon **(Mottar J et *al*., 1993).** Le principe de cette méthode peut être appliqué :

► Soit à une méthode dite en « point final » si la mesure est faite au bout d'un temps d'incubation déterminé.

► Soit à une méthode cinétique, si les mesures de densité optique sont faites en continu ou au moins périodiquement pendant la réaction.

◙Colorimétrie :

Dans cette méthode, le LAL est combiné à une substance chimique : Le 5-aminoacide-polypeptide (5-pep) lié à la par anitroaniline (PNA). Sous l'action de la coagulase activée la liaison 5-pep-PNA est coupée, libérant ainsi le PNA, qui peut être mesuré par spectrophotométrie (À 545 nm). La vitesse de libération du PNA est fonction de la concentration en endotoxines dans l'échantillon **(Lanvin G, 2002).**

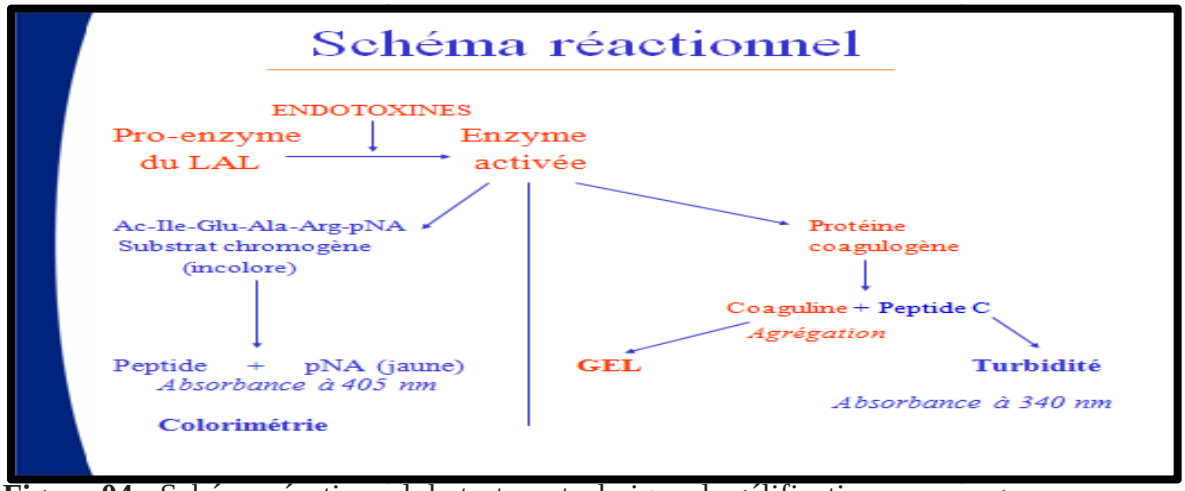


Figure 04 : Schéma réactionnel du test par technique de gélification « en rouge » (Bang et Levin. 1956).

4. Raisons de l'exigence d'un contrôle des endotoxines bactériennes

Pour assurer un protocole bien établi selon les recommandations internationales L'USP,FDA(Food and Drug Administration) et la politique de la pharmacopée européenne concernant les endotoxines bactériennes dans les substances pour usage pharmaceutique par raisonnement que les endotoxines sont les pyrogènes les plus fréquents dans les produits pharmaceutiques. Il convient donc que toute préparation administrée par voie parentérale soit stérile et satisfasse à l'essai des endotoxines bactériennes décrit dans la Pharmacopée Européenne **(Ph. Eu, 2017 9.0)**

Les substances destinées à être utilisées dans des préparations parentérales doivent satisfaire à l'essai des endotoxines bactériennes, quelle que soit leur origine, car la contamination par des endotoxines bactériennes peut se produire avant ou pendant le processus de fabrication et ne peuvent pas être facilement éliminées par le processus de fabrication, d'où vient la nécessité de détection les endotoxines bactériennes le plus tôt possible dans le processus de fabrication.

5. Exigences relatives aux endotoxines bactériennes dans la Pharmacopée Européenne.

Dans la monographie générale Substances pour usage pharmaceutique (2034) ainsi que dans les monographies spécifiques de substances pour usage pharmaceutique, la Ph. Eu exige un contrôle des endotoxines bactériennes pour les substances utilisées dans la fabrication de préparations parentérales. Ces monographies renvoient aux chapitres généraux 2.6.14.Endotoxines bactériennes et 5.1.10. Recommandations pour la réalisation de l'essai des endotoxines bactériennes **(Ph. Eu, 2017 9.0).**

La monographie générale des préparations parentérales (0520) précise que les préparations pharmaceutiques destinées à être utilisées par voie parentérale doivent satisfaire à l'essai des endotoxines bactériennes ou, dans les cas justifiés et autorisés, à l'essai des pyrogènes **(Ph. Eu, 2017 9.0)**

Chapitre 03

Test lysat d’amoebocyte de Limule (LAL), technique de gélification.

I. Introduction

Le test de limule qui a été adopté comme le test le plus répondu dans toutes les Pharmacopées, permet de détecter et de quantifier les endotoxines, tant dans les matières premières utilisées pour la production à usage pharmaceutique, pour le control en cours de fabrications des taux d'endotoxines, les médicaments injectables ou des solutions pour l'administration parentérale, y compris les produits biologiques et ainsi que le control de l'eau qui doit être totalement apyrogène **(Dekker M. 2003)**. Ce test peut être réalisé par des techniques de gel caillot ou de spectrophotométrie (Turbidimétrique et colorimétrique), basées sur le principe d'un ensemble de réactions enzymatiques **(Bang et *al.*, 1956).**

Dans les années 50, les scientifiques ont découvert que cette réaction est enzymatique et que les enzymes sont situés dans les granules des amoebocytes **(Howell. 1885).** Ils ont démontré que la coagulation était déclenché par un composant structurel unique de la paroi cellulaire bactérienne « endotoxine », et on sait actuellement que la réaction menant à la coagulation découle d'une cascade d'étapes d'activation enzymatique **(Bang et Levin 1955).** Bien que l'on ne comprenne pas exactement la réaction complète, la dernière étape est bien décrite. La protéine de coagulation (coagulogène) est dissociée par l'enzyme de coagulation activée ; les produits de cette dissociation insoluble coagulent par interaction ionique pour former la trame de gel **(Bang et Levin 1955).**

I1. Définitions

1. LAL

Le lysat d'amoebocytes des limules ou également connu sous le nom de test LAL, c'est un test *in vitro* recommandé dans les pharmacopées internationales comme méthode spécifique de détection des endotoxines bactériennes.

Le LAL, c'est un ensemble enzymatique extrait à partir des cellules sanguines (amoebocytes) ou hémolymphe d'un animal marin *Limulus. Polyphemus* **(Figure05)** ou *Xyphosura. Polyphemus,* et d'autre espèce comme *L. Tridentatus, L. Tachypleus*…etc. communément appelé la limule ou crabe en fer à cheval. C'est un arthropode marin de la classe des Mérostomes, une espèce inchangée depuis l'époque des dinosaures, caractérisée depuis sa découverte fortuite par sa particularité et spécificité du « sang bleu » ainsi que « les amoebocytes » circulantes dans cela circulation sanguine **(Morita et al 1985).**

Les protéines lyophilisées à partir des amoebocytes manifestent une cascade de réactions enzymatiques lors de leur contact avec les endotoxines **(LOEB Léo 1902).**

2. Sang bleu de limule

Le précieux sang bleu distinctif du limule porte des propriétés étonnantes permettant de détecter rapidement certains poisons et de diagnostiquer des maladies mortelles. Sa morphologie, son mode de vie et la place qu'il occupe au sein de différentes cultures font de ce « fossile vivant » un animal fascinant **(Amilabo. 1990).**

Les Limules n'ont pas le même mode de transport de l'oxygène que les mammifères, celui des mammifères se caractérisent par leur sang rouge à cause du fer qui est utilisé dans l'hémoglobine pour le transport d'oxygène. Par contre les limules se caractérisent par du sang de couleur bleu, du au cuivre qu'elles utilisent dans l'hémocyanine pour transporter l'oxygène dans le corps **(Levin et Bang, 1956).**

C'est tout à fait fortuitement que les chercheurs découvrent en **1956**, les propriétés du sang du Limule et c'était en présence d'endotoxines où un petit limule a été utilisé au laboratoire après l'avoir introduit dans de l'eau contenant une endotoxine de la bactérie *E. coli.* Comme les Limules se caractérisent par leur « système circulatoire ouvert »,**(Figure 06)** après quelques minutes la solution a changé de couleur et de densité**(MIKKELSEN Tom 1956).**

Cette grande sensibilité explique qu'au cours du contact aux endotoxines, le liquide bleu coagule, s'épaissit et crée un caillot protecteur pour ne pas contaminer le reste du corps, donc ce liquide, contient une substance appelée LAL, était utilisé pour tester la présence de bactéries, et plus particulièrement d'endotoxines **(Levin et Bang, 1956).**

3. Amoebocytes

Les amoebocytes sont des cellules composantes et circulantes dans le sang des Limules. La cellule amoebocyte comporte un nucleus central comme une vraie cellule Eucaryote,**(Figure 08)**réagissant en présence d'endotoxines bactériennes en produisant une protéine « LAL » qui transforme l'hémolymphe en gel par une cascade de réactions enzymatiques face aux endotoxines bactériennes, responsables du phénomène de coagulation **(Levin J. 1978).**



Figure 05 : Crabes en fer à cheval d'espèce de*Limulus. Polyphemus.*



Figure 06 : Extraction de sang bleu des limules

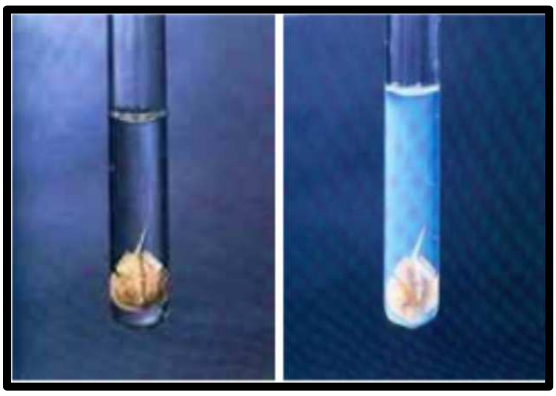


Figure 07 : Turbidité densité de la solution traitée par endotoxine de la bactérie de *E. coli* au bout de quelques minutes (MIKKELSEN Tom labiratory1956)



Figure 08 : Observation microscopique d'Amoebocytes en réaction avec les endotoxines

III. Découverte

En **1885Howell** décrivit la coagulation du sang du limule au contact de l'air, un an plus tard **LOEB Léo** a montré les différents aspects de la coagulation des amoebocytes de *Limulus .polyphemus.*

En **1956 BANG** a découvert au laboratoire de biologie marine de Woods Hole (Massachusetts), que les bactéries à gram négatif provoquent la coagulation du sang du limule. Quelques années plus tard **BANG** et **LEVIN** ont déterminé que cette réaction est à 100% une réaction enzymatique.

IV. Principe du LAL

Le principe du test LAL est une réaction entre l'endotoxine et une substance (protéine coagulable) contenue dans les amoebocytes. Lorsque l'endotoxine entre en contact avec le réactif lyophilisé du LAL **(Bang et Levin 1956)**, elle initie une série de réactions enzymatiques qui entraînent l'activation d'une voie de production d'au moins trois sérine-protéase zymogènes (facteur C, facteur B et enzyme favorisant la coagulation).Cette voie modifie le coagulogène amibien (une protéine coagulable de type fibrinogène invertébrée) pour former un gel de coaguline **(Levin J.1987)**.

En fait, le mécanisme de coagulation du sang de limule en présence d'endotoxines est le résultat d'une série de réactions enzymatiques. Les facteurs C et B, présents dans les amoebocytes, sont des facteurs initiateurs de la réaction etse lient respectivement avec les endotoxines et les (1-3)-β-D-glucanes (composés de la paroi cellulaire des moisissures) **(Tsuchiya M.1990).**L'étape limitante de la réaction est le seuil d'activation du facteur C par l'endotoxine, ce seuil étant directement lié à la concentration d'endotoxine.

En plus du facteur C et B réagissant aux endotoxines, les amoebocytes contiennent le facteur G qui réagit avec le (1-3)-β-D-glucanes. De ce fait, les préparations commerciales de lysat contiennent pour la plupart des facteurs C et G mais le dosage des(1-3)-β-D-glucanes nécessite un traitement spécial. Afin d'éviter toute ambiguïté, certains laboratoires préfèrent retirer le facteur G par chromatographie **(Greef M et al., 2002).**

Une fois que le facteur C est activé par l'endotoxine, il active à son rôle le facteur B nécessaire à la catalysation des proenzymes caogulogènes. Une charge cationique des ions Mg, Ca et Na change l'enzyme coagulogène en coguline. **(Bang et Levin. 1956).**

Le réactif LAL est fourni avec une sensibilité ou une étiquette identifiée(λ) **(Brunson KW et *al.*, 1974).**

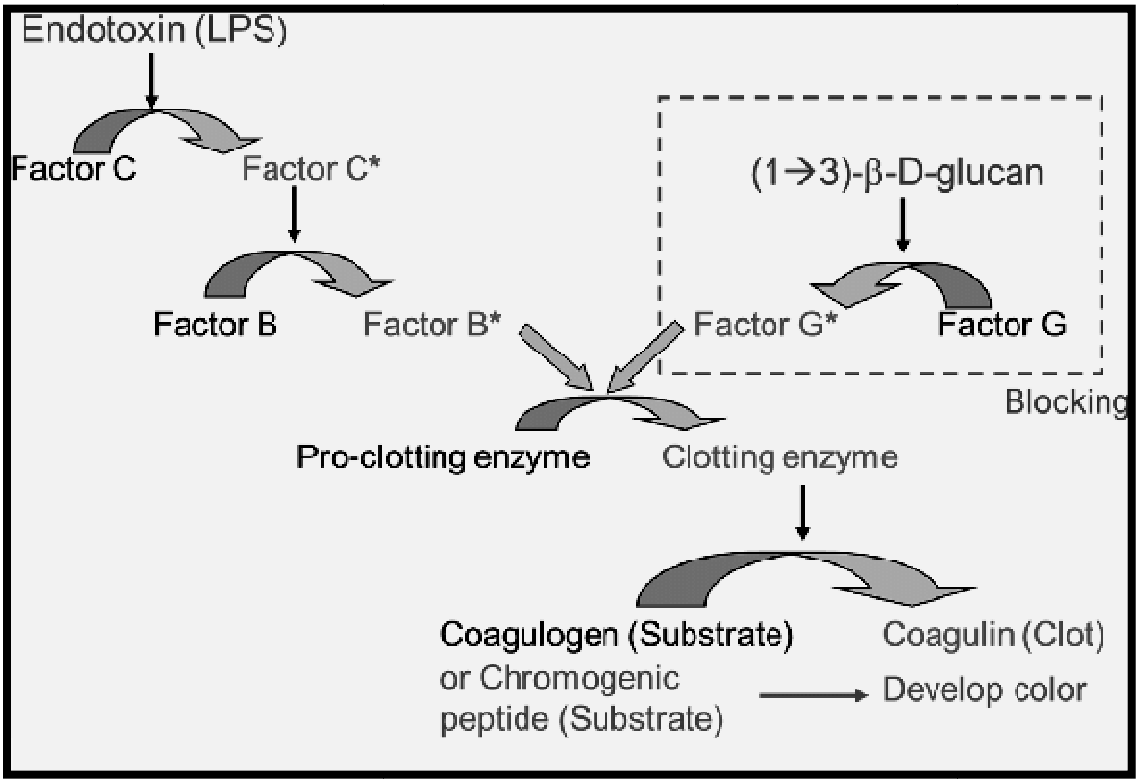


Figure 09 : Schéma représentatif des différents facteurs activés par les endotoxines (Bang et Levin 1956).

V. Caractéristiques liées au test LAL

1. Sensibilité du lysat

La sensibilité ʎ du lysat est définie comme la plus faible concentration d'endotoxines que le lysat peut détecter et former un gel-caillot. Cette vérification doit être faite avant toute utilisation d'un nouveau lot du lysat, elle permet la validation de l'essai, du matériel, du laboratoire **(Ph. Eu 9.0 2017).**

Avec la méthode par gélification, l'essai est réalisé dans un intervalle de sensibilité [ʎ/2 - 2ʎ]. La conformité est qualifiée si la sensibilité trouvée est comprise dans cet intervalle **(Ph. Eu 9.0. 2017).**

2. Facteurs d'interférence de l'essai LAL

La plupart des essais en utilisant le LAL ont été réalisés avec des substances pharmaceutiques et médicales. Il est admis que ce test bien que précis demeure sensible aux interférences **(Cooper. 1990).**Durant l'essai, les principales causes d'interférences doivent être évitées en respectant les intervalles appropriées des valeurs du pH et la dilution du produit à examiner. Certains produits ne peuvent pas être directement soumis à l'essai des endotoxines parce qu'ils ne sont pas miscibles avec les réactifs, que leur pH ne peut pas être ajusté à [6 - 8]**(Sullivan et *al.*, 1976),**Le control préliminaire des interférences permet d'éviter l'obtention des résultats non souhaitables (inhibition ou activation de gélification) **(Albaugh BP.1982).** Dans ce cas, il est nécessaire d'effectuer une recherche préliminaire des facteurs d'interférence avant la réalisation de l'essai de routine **(Ph. Eu 9.0. 2017).**

Pour assurer la conformité de l'essai, il faut donc se mettre devant l'objectif de cette recherche préliminaire en testant la sensibilité du lysat en présence du produit à examiner qui ne doit différer pas significativement de la sensibilité du lysat en l'absence du produit.

La méthode A de gélification utilise à cet effet un critère simple ; l'hypothèse est acceptée lorsque la sensibilité du lysat en présence du produit n'est pas inferieure à ʎ/2 fois ni supérieure à 2 ʎ **(Levin J et *al*., 1987).**

- **Les principales causes d'interférence :**

◙ **Température d'incubation :** Elle doit rester comprise entre 36°C et 38°C, la sensibilité du test est quasi nulle à 25°C, le LAL est détruit à une température supérieure à 45°C.

◙ **LAL et le pH :** Les réactions enzymatiques n'ont lieu que dans des zones de pH bien défini. La réaction LAL est, en fait, une cascade de réactions enzymatiques dont le résultat est le clivage de coagulogène avec apparition d'une turbidité ou d'une gélification. Théoriquement chaque réaction de la cascade a son propre pH optimum, mais du point de vue pratique, l'intérêt pour l'utilisateur est de connaitre la gamme globale de pH de travail. Cette gamme de pH pour le lysat est de 06 à 08**(Sullivan et *al.*, 1976),**. Le pH optimum de la réaction LAL établi avec la méthode du gel point final **(Young et AL., 1976).** Il est de 7.5 à 37°C **(Ph. Eu 9.0).**

◙ **Adsorption des endotoxines :** le matériel ne doit pas adsorber les endotoxines et ne doit pas avoir une interaction avec le LAL. Il doit être exempt a 100% d'endotoxines.

◙ **La présence de certains cations :** Les cations divalents Ca++ et Mg++ interviennent dans le mécanisme de réaction du LAL en transformant la proenzyme en enzyme active. La réaction du LAL peut être activée ou inhibée par des concentrations en Ca++, Mg++ et Na+ excessives. En réalité, plusieurs études ont permis de déterminer une fourchette de concentrations pour lesquelles la réaction se produit normalement mais, en dehors de cette fourchette, les cations peuvent être activateurs ou inhibiteurs **(Levin J et *al*., 1987).**

◙ **Facteur anti-LPS :** Un facteur inhibant la cascade enzymatique de la réaction de gélification a été découvert en 1982 dans les amoebocytes et est appelé « facteur anti-LPS » **(Tanaka. S et al., 1982 et Morita. T et al., 1985).** C'est une protéine basique simple formée d'une seule chaine polypeptidique dont la séquence en acides aminés est connue. Il a un caractère amphipatique, l'extrémité NH2 terminale est hydrophobe et des charges positives sont réparties des boucles le long de la chaine **(Morita. T et al., 1985)**. Il inhibe spécifiquement l'activation médiée par les LPS au niveau du facteur C, en agissant sur les LPS. Les boucles chargées positivement doivent avoir une interaction avec les groupes phosphates du lipide A **(Tanaka. S et al., 1982).** Il a un rôle dans a défense biologique des Limules contre les microorganismes. Ce facteur est actuellement très étudié car il présente un intérêt pour bloquer l'effet létal des LPS **(Muta. T et al,. 1987)**. Il a un effet d'inhibition et de la croissance des bactéries à Gram négatif.

◙**(1-3)-β- D Glucane (composé de la paroi des moisissures) :** Les amoebocytes contiennent le facteur G qui réagit avec (1-3)-β-Glucane et entraine une étape limitante de la réaction avec les endotoxines, qui devraient avoir une réaction avec le facteur C **(Tsuchiya A et al 1990)**.

VI. Réactifs et préparation des solutions d'essai

1. Réactifs

◙ Test lysat d'amoebocytes des limules

Produit lyophilisé obtenu à partir du lysat d'amoebocytes du crabe *Limulus.Polyphemus ;* ce lysat d'amoebocytes réagit à la fois aux endotoxines et à certains β-glucanes, pour cette raison il est préparé en éliminant le facteur G qui réagisse aux glucanes du lysat d'amoebocytes ou en inhibant le système réactionnel du facteur G du lysat **(Ph. Eu 9.0. 2017).**

◙Control Standard Endotoxine

Le Control Standard Endotoxin E. coli 055 B:5 (CSE) est une norme largement utilisée pour le test d'endotoxines, Il est convenablement normalisé et calibré par rapport à l'étalon de référence des endotoxines (RSE) et est utilisé pour les tests de routine d'endotoxines bactériennes pour vérifier la conformité du test**(Ph. Eu 9.0. 2017)**

◙Eau EEB

C'est de l'eau spéciale pour des préparations injectables apyrogènes, nécessaire à la reconstitution du réactif à essai, les contrôles et les étalons d'endotoxines aussi pour diluer les échantillons. Elle devrait être exempte d'endotoxines bactériennes ainsi que de toutes substances pyrogènes. Elle est préparée par distillation de triplet dans un appareil avec un arrangement pour éliminer les endotoxines **(Ph. Eu 9.0. 2017).**

2. Préparation des solutions

◙Préparation d'une solution mère d'endotoxine standard

Une solution-mère d'endotoxine standard est préparée à partir d'un étalon de référence d'endotoxines (RSE) qui a été étalonné par rapport au Standard international pour les endotoxines, dont il faut suivre les spécifications de la notice et de l'étiquette pour la préparation et la conservation de la solution mère d'endotoxines **(Ph. Eu. 9.0. 2017)**

L'endotoxine est exprimée en unités internationales (UI) d'endotoxine.01 unité

◙Préparation d'une solution d'endotoxine standard

A partir da la préparation de la solution mère d'endotoxine standard, préparer des dilutions en série appropriées de solution d'endotoxine standard en utilisant de l'eau EEB. Il est nécessaire de l'utiliser le plus vite possible après la préparation et l'agitation, pour éviter la perte d'activité par adsorption **(Ph. Eu. 9.0. 2017)**

◙Préparation de solutions d'échantillons

Tous les médicaments injectables à analyser doivent être dilués en utilisant de l'eau EEB avec une dilution appropriée et notée dans la fiche technique de chaque produit **(Ph. Eu. 9.0. 2017)**. Si nécessaire d'ajuster le pH des solutions (ou la dilution de celle-ci) de manière à ce que le pH du mélange et de la solution d'échantillon soit compris dans la plage de pH

spécifiée par le fabricant, généralement de 6,0 à 8,0**(Sullivan et *al.*, 1976).** Le pH peut être ajusté en utilisant un acide, une base ou un tampon approprié, comme recommandé par le fabricant du lysat. Les acides et les bases peuvent être préparés à partir des concentrés ou des solides avec de l'eau apyrogène dans des récipients exempts d'endotoxines détectables. Les tampons doivent être validés pour être exempts d'endotoxines détectables et de facteurs interférents **(Ph. Eu. 9.02017)**

Une évaluation importante de l'application du test d'endotoxines, est l'utilisation de la limite endotoxine, dont l'unité universelle d'évaluation est « l'unité endotoxines » (UE). La dose seuil pyrogène pour un être humain adulte est environ **5 UE / kg / h(Ph. Eu 9.0. 2017).**

Toute application d'un produit à une dose supérieure à 5 EU / kg / h très probablement peut entraîner une réponse pyrogène. Il a donc été établi que **5 UE /kg / h** est la limite maximale pour la plupart des produits injectables **(Ph. Eu 9.0. 2017).**
On suppose également que la moyenne du poids humain adulte est de 70 kg, donc la quantité totale d'endotoxine pouvant être administrée à un homme par heure ne devrait pas dépasser 350 UE (70 kg × 5 UE = 360 UE / adulte).

Le terme K est couramment utilisé pour représenter la limite d'endotoxine. Pour un produit injectable standard **K = 5 UE / kg / h**.
Le calcul de la limite d'endotoxine pour un médicament injectable est illustré dans l'exemple suivant:
Le produit A a une dose humaine maximale (corps entier) de 1 g

1) **Dose par Kg** = 1g/ 70Kg = 14.3 mg/ Kg
2) **Limite endotoxine** = 5 UE/Kg 14.3 mg/Kg = 0.35 UE/mg

La concentration du produit (puissance dans le produit final) est utilisée pour convertir la limite d'endotoxine dans EU / mL. Si la concentration du produit est de **100 mg / ml**, le calcul fournira le UE/ mL du produit fini. Il est utile d'utilise des unités, car ce sont généralement les unités utilisées dans le test LAL (comme décrit ci-dessous)
Limite endotoxine= 0.35 EU/mg100 mg /mL= 35 EU/mL.

Il est important de noter que cette limite est basée sur une concentration de produit spécifique.

Si la concentration du produit change, la limite d'endotoxine changera. Ceci fournit la limite maximale pour ce produit à cette concentration. C'est commun pour tout fabricant de sélectionner une limite d'endotoxines inférieure à cette limite maximale.

La limite d'endotoxine de chaque échantillon nécessite une détermination avant de conduire l'endotoxine.

◙Détermination de la dilution maximale significative

La dilution maximale significative (DMS) est la dilution maximale significative admissible d'un échantillon à laquelle la limite d'endotoxine peut être déterminée **(Ph. Eu 9.0. 2017).**

La détermination de la DMS à partir de l'équation suivante:

DMS = (Limite d'endotoxines × concentration de la solution d'échantillon) / ʎ

Partie II

Etude expérimentale

Matériels et méthodes

1- Lieu d'étude : Notre étude s'est déroulée au laboratoire de contrôle qualité et service de toxico-pharmacologie aux complexes antibiotiques SAIDAL de Médéa.

2-objectif : Dans le cadre de notre projet de fin d'étude, nous avons réalisé une étude expérimentale analytique, comparative et qualitative des tests de recherche des endotoxines bactériennes (substance pyrogènes exogènes biologiques qui provoquent la fièvre) par :

- *in-vivo* : Test pyrogène de lapin.

- *in-vitro* : Essai au lysat d'amoebocytes de limules.

L'objectif de notre travail est de qualifier et valider le test accompli dans l'évaluation d'apyrogénicité du produit pharmaceutique NaCl (matière première) et NaCl hypertonique à 10% SAIDAL (produit fini) et cela par observation des réglementations d'application conditionnées définies par la Pharmacopée Européenne et la FDA.

I. Matériels

1. Matériel non biologique

Durant notre stage, nous avons utilisé le Kit LAL (lysat d'amoebocytes de limules) de laboratoire Charles River **(Annexe 01)** ; appareillage, verrerie **(Annexe 02)**

2. Matière première

La matière première, sujet d'étude ; est le Chlorure de Sodium (NaCl) (N° lot : 17BP15, Fournisseur : ESCO), présenté sous la forme de poudre et utilisé pour préparation de solution à usage parentéral.

3. Produit fini

Le produit fini est le Chlorure de Sodium hypertonique à 10% SAIDAL.C'est un sérum à usage parentéral, indiqué pour corriger les pertes des sels minéraux et apporter du sodium en cas d'alimentation par voie veineuse, ainsi que dans le cas de déshydratation, l'hypovolémie (diminution du volume de sang total de l'organisme), pression artérielle élevée (hypertension)…etc. Nous avons échantillonné pour notre étude 25 ampoules appartenant au lot N°001 et de provenance de fournisseur ANTIBIOTICAL.

4. Matériel biologique

Le modèle animal utilisé dans notre étude in vivo est le lapin albinos néozélandais **(Tableau I)** dans l'intérêt d'établir une investigation pour la détection des substances pyrogènes, car il possède plusieurs avantages remarqués par la science politique :

●Petite taille (mais plus grand que les souris et les rats, ce qui est plus pratique pour les manipulations trop délicates).

●Pouvoir être élevé dans des conditions maitrisées (en laboratoire).

●Bonne réponse immunologique.

●Très sensibles aux agents tératogènes (ce qui permet d'observer sa réaction qui est très proche de celle de l'être humain).

Tableau I : Caractéristique et condition d'hébergement des animaux de l'expérimentation.

Animal	Lapin néozélandais.
Référence	Lapins Albinos d'origine Swiss importés d'IFFA- CREDO (Lyon).
Poids	2 – 3 Kg (n'est pas inferieure à 1.5 Kg).
Nourriture	Alimentation granulée O.N.A.B.
Boisson	Eau de robinet (eau potable) sur un système d'abreuvement (Circuit fermé).
Température	Ambiante.
Elevage	Antibiotical- SAIDAL- Médéa.

.

II. Méthodes

Au niveau du laboratoire de SAIDAL (Antibiotical Médéa), le produit NaC l(matière première et produit fini) a été analysé *in-vivo* et *in-vitro* dans le but de détection des endotoxines bactériennes par technique microbiologique et toxico-pharmacologique en raison d'évaluation et de validation de la technique alternative la plus fiable (test LAL).

1. Expérimentation *in vivo*

1.1. Dépyrogénisation du matériel

Cette étape consiste à une réduction du niveau de la substance pyrogène et est principalement utilisée dans la stérilisation des flacons à essai par une chaleur sèche. Elle est réalisée le jour qui précède l'essai, elle se fait à 200°C pendant 4 heures après lavage à l'eau stérile et apyrogène

1.2. Préparation des solutions à injecter

- **solution préliminaire**

Dans le but de déterminer si notre produit NaCl contient des substances pyrogènes ou non, nous avons effectué tout d'abord une injection préliminaire qui sert comme un contrôle préliminaire aux lapins avant d'effectuer l'analyse principale. La solution de NaCl R à une concentration 9g/L a été chauffée à une température voisine de 38.5°C pendant 10- 15 min.

- **La solution à analyser**

La solution a été préparée sous hotte à flux luminaire par une dilution de la matière première. 1g dans 9 mL d'eau apyrogène. Puis le mélange subis un chauffage pour arriver à une température de 38.5°C avant l'injection, une température égale à la température corporelle initiale. Le volume d'injection est de 10 mL/Kg.

1.3. Conditionnement des animaux au laboratoire

On a utilisé dans notre étude des lapins adultes, en bonne santé, mâles ou femelles dont le poids n'est pas inferieur à 1.5 Kg, nourris suivant un régime complet, équilibré et exempt d'antibiotiques et dont la masse corporelle n'a subi aucune diminution au cours de la semaine qui a précédé l'essai.

Les lapins sont maintenus individuellement dans un lieu tranquille (cage individuelle en inox) équipées d'une mangeoire en inox et une tétine qui permet à l'animal de prendre l'eau potable de puis le système d'abreuvement et à une température uniforme appropriée. Une nuit avant le lancement de l'essai, les lapins sont privés de la nourriture et de l'eau. L'essai doit être effectué dans un lieu tranquille où aucune perturbation ne risque d'exciter les lapins.

La température ne s'écarte pas de plus de 3°C de celle de la pièce où les lapins sont séjournés pendant au moins les 18h qui précède l'essai.

1.4. Préparation des lots des lapins

09 lapis mâles, de poids supérieur ou égale à 1.5 Kg et de température initiale qui ne dépasse pas 39.8°C. Les lapins sont répartis en 03 lots en fonction du produit et sa dose **(Tableau II).**

Le jour de l'essai, les lapins sélectionnés sont acheminés de la salle de stabulation vers la salle de manipulation. Après la pesée, nous avons mis les lapins dans des boites à contention pendant une période de 30 minutes avant la première prise de température. La prise de la température s'est réalisée grâce à des sondes. En effet, l'extrémité flexible de la sonde est introduite dans le rectum du lapin à une profondeur de 05 à 10 Cm**.** Les différentes sondes sont branchées à un appareil pour enregistrer les températures corporelles.

1.5. Enregistrement des températures initiales de contrôle préliminaire.

L'enregistrement se fait à l'intervalle de 15 minutes pendant 90 minutes avant l'injection du produit à tester **(Tableau III).** Dans cet essai préliminaire, on a retenu les lapins qui présentent :

- Une température entre 38 et 39.8°C.
- Des écarts qui ne dépassent pas 0.2°C entre un intervalle de temps
- Les températures initiales ne doivent pas s'écarter entre elles de plus de 1 à 1.04 °C.

1.6. Injection des solutions

Les solutions NaCl (M.P) en solution et NaCl (P.F) préalablement chauffées à38.5°C ont été injectées au niveau de la veine marginale de l'oreille du lapin avec une dose de 10 mL/Kg pour chaque lapin des deux lots correspondants. La durée de l'injection ne doit pas dépasser 4 mn.

1.7. Enregistrement des températures

Il débute 15 minutes après l'injection du NaCl (M.P et P.F) et la mesure se poursuit pendant 03 heures à intervalle de 15 minutes **(Tableau IV).**

Tableau II : Tableau représente la répartition des lots des lapins dans l'expérience.

Lots	Poids (1.5 – 4) Kg.	Essai Préliminaire 10 mL/Kg	NaCl M.P 10 mL/Kg	NaCl P.F 10 mL/Kg
3 Témoins	+	+	–	–
3 Lapins traités	+	+	+	–
3 Lapins traités	+	+	–	+

Tableau III : Tableau représentatif de la mesure de température corporelle des lapins à essai pondent 90 minutes (Control préliminaire).

Sonde N°	Lapin N°	Poids Kg	T= 0	T= 15	T= 30	T= 45	T= 60	T=75	T= 90

Mesure de température corporelle nécessaire pour assurer le bon état des lapins pour effectuer l'essai principale.

Tableau IV : Tableau représentatif de la mesure de température corporelle des lapins à essai pondent 3 heures (Essai principale).

Sonde N°	Lapin N°	Poids Kg	T Initiale	T 0'-15'	T 15'-30'	T 30'-45'	T 45'-60'	T 60'-75'	T 75'-90'	T ……	T 180

$$\Delta T = T\ max - T\ initiale$$

$$\sum \Delta T = \Delta T1 + \Delta T2 + \Delta T3 + \Delta T4 + \ldots\ldots \Delta Tn$$

1.8. Expression des résultats :

La lecture de l'essai de pyrogène de lapin se fait principalement par le suivi de variation de température corporelle des lapins sélectionnés pour le test principale durant 3 heures, dont le premier lot est pour la matière première. Le deuxième lot est gardé comme un témoin négatif et enfin le troisième lot est pour le produit fini.

2. Expérimentation *in vitro*

2.1. Préparation des solutions

2.1.1. Préparation du Control Standard Endotoxin (CSE)

Le Control Standard Endotoxine « *E. coli* O55 : B5 » est une norme largement utilisé pour le contrôle standard lors de l'exécution du test LAL, pour assurer un test valide, il s'agit d'un extrait purifié de E. coli O113 H10 (Endotoxine Standard de référence). En effet L'indicateur d'endotoxine est conçu pour la validation ou la surveillance des processus de dépyrogénation (**Wear M. 1988).** Afin de le préparer, il faut suivre les étapes suivantes :

● Reconstitution du CSE en utilisant 7.5 mL l'eau pour essai des endotoxines bactériennes (EEB) fournie en suivant scrupuleusement les instructions du fabriquant mentionnée sur le flacon, la notice d'utilisation et le certificat d'analyse.

● Mélange à l'agitateur (Vortex) vigoureusement pendant 5 minutes le CSE et pendant 1 minute avant chaque utilisation.

● Préparation de dilution de CSE dans l'eau EEB pour obtenir une solution d'une concentration de 1UE/mL (16ʎ) puis mélanger les dilutions préparée pendant 3 minutes.

● Préparation des solutions à 0.25 UE/mL (2ʎ) en utilisant l'eau EEB.

● Mélanger la dilution sur le vortex pendant 3 min.

2.1.2. Reconstitution du lysat LAL

La reconstitution du lysat doit être appliquée bien rigoureusement, et suit les étapes suivantes :

■ La poudre du lysat est recueillie dans le fond du flacon en tapotant sur une surface dure.

■ Selon les instructions du fabricant, on doit réhydrater le lysat avec 5.2 mL d'eau EEB ou de tampon indiqué juste avant son utilisation.

■ Mélange du lysat reconstitué doucement jusqu'à ce qu'il se dissolve complètement et en évitant la formation de mousse.

■ Conservation le lysat au réfrigérateur ou au congélateur, comme indiqué par le fabriquant

2.1.3. Détermination de Dilution Maximale Significative (DMS)

La dilution maximale significative est la dilution maximale admissible d'un échantillon auquel la limite d'endotoxine peut être déterminée, est calculée à laide de la formule :

$$\textbf{DMS} = \frac{Limiteenendotoxine * Concentrationdelasolutionàexaminer}{\lambda}$$

Limite en endotoxine (LE) : La limite en endotoxine d'une substance administrée par voie parentérale, définie sur une base posologique, est égale à : K/M

K= Dose seuil d'endotoxines ayant un effet pyrogène, par kilogramme de masse corporelle.

M= Dose maximale recommandée pour le produit, en bolus, par kilogramme de masse corporelle.

Chaque produit destiné à une utilisation parentérale détient entièrement une fiche technique, qui possède la description du produit et des données nécessaires pour effectuer le calcul de la DMS. La détermination de la DMS de NaCl matière première (N° lot 17BP151) et NaCl 10% produit finit (N° lot 001) est représentée dans le **(tableau V).**

Tableau V : Calcul de la DMS pour le M.P et P.F du NaCl.

Calcul de la DMS pour le NaCl (M.P).	**Calcul de la DMS pour le NaCl (P.F).**
LE= 5UI/g avec 1UI = 1EU. Concentration de NaCl = 1g/mL. λ= 0.125 UI/mL. DMS = $\frac{5*1}{0.125}$ = 40 La dilution (D) de l'échantillon effectuée inferieure à la DMS. Il peut être judicieux de diluer 1 ml de solution à tester à 20 ml, $\frac{DMS}{2}$	LE= 3.6UI/mL. avec 1UI = 1EU. Concentration de NaCl 10% = 0.952g/mL. λ= 0.125 UI/mL. DMS = $\frac{3.6*0.952}{0.125}$ = 27.42 La dilution (D) de l'échantillon effectuée inferieure à la DMS.Il peut être judicieux de diluer 1 ml de solution à tester à 20 ml, $\frac{DMS}{2}$
D= 1/20	**D= 1/10**

2.2. Qualification initiale de l'EEB (Contrôles préliminaire)

2.2.1. Conformité de la sensibilité déclarée du lysat

Avant d'utiliser le lysat pour la réalisation de chaque nouvel essai de recherche des endotoxines bactériennes, il faut tout d'abord confirmer la sensibilité déclarée ʎ de la solution du lysat, exprimée en UE/mL, sur une solution de 4 exemplaires. Ce contrôle est effectué à chaque fois qu'un nouveau lot de lysat est utilisé ou que des modifications susceptibles d'effectuer le résultat de l'essai sont apportées aux conditions expérimentales **(Tableau VI).** Pour effectuer cette conformité, il faut :

● Une préparation en 4 exemplaires d'une série de solutions étalons comprenant au minimum quatre concentrations respectivement équivalentes à **2ʎ, ʎ, 0.5ʎ, 0.25ʎ** en diluant la solution mère étalon d'endotoxines avec de l'eau EEB.

● Un prélèvement de 0.1 mL de chaque solution étalon **2ʎ, ʎ, 0.5ʎ, 0.25ʎ**puis introduites dans des tubes de réaction dépyrogénés et étiquetés, en quatre exemplaires.

●Un prélèvement de 0.1 mL d'eau EEB comme témoin négatif (en quatre exemplaires).

● Un ajout 0.1 mL du lysat reconstituer dans chaque tube et mélanger délicatement.

Tableau VI : Résumé de la méthode de confirmation de la sensibilité du lysat.

Solution étalons	Concentration en endotoxines	EEB	Lysat en mL.	Nombre d'exemplaire
2ʎ	0.1 mL de 2ʎ	_	0.1 mL.	4
ʎ	0.1 mL de ʎ	_	0.1 mL.	4
0.5ʎ	0.1 mL de 0.5ʎ	_	0.1 mL.	4
0.25ʎ	0.1 mL de 0.25ʎ	_	0.1 mL.	4
Témoin négatif de l'eau EEB	_	0.1mL.	0.1 mL.	4

<u>Critère d'acceptation</u> : La valeur ainsi obtenue est la sensibilité mesurée de la solution de lysat en UE/mL ou UI/mL. Si cette valeur est comprise entre 0.5ʎ et 2ʎ (bornes incluses), la sensibilité déclarée est confirmée et utilisée pour les essais effectués avec ce même lysat. Tout en déterminant le point final est le calcule de la moyenne logarithmique puis l'antilogarithme, dont :

- Concentration géométrique de point final : anti log= $\frac{\sum e}{f}$.
- Σ e = la somme des concentrations limites du log de la série de dilution utilisée.
- f = le nombre de tubes à essai répliqués.

2.2.2. Recherche de facteurs d'interférences (pH = « 6.98 - 7.16 » dilution (;1/2 ;1/3 et 1/4) du NaCl (M.P et P.F)

Certains produits ne peuvent pas être directement soumis à l'essai des endotoxines bactériennes parce qu'ils ne sont pas miscibles avec les réactifs, que leur pH ne peut êtreajusté à 6,0 – 8,0 ; ou qu'ils inhibent ou activent la gélification par induction de facteur de d'interférence du produit à analyser « Dilution et pH ». Dans ce cas il est donc nécessaire d'effectuer une recherche préliminaire de ces facteurs d'interférence. Une fois ceux-ci mis en évidence, il faut démontrer l'efficacité de la méthode employée pour les éliminer.

L'objectif de cette recherche préliminaire, est de tester l'hypothèse nulle, qui note que la sensibilité du lysat en présence du produit à examiner ne diffère pas significativement de la sensibilité en l'absence du produit. L'hypothèse nulle est acceptée lorsque la sensibilité du lysat en présence du produit n'est pas inférieure à **0.5ʎ** ou supérieure à **2ʎ**. Pour cela nous avons préparé des solutions A, B, C et D comme indiqué dans le tableau ci-dessous et nous avons utilisé des solutions à examiner avec une dilution inferieure à la DMS (1/2, 1/3, 1/4) mL ne contenant pas d'endotoxines détectables. Dans chaque tube des solutions A, B, C et D de volume 0.1mL on ajoute 0.1mL du lysat dans tous les tubes.

Tableau VII : Résumé des préparations des solutions pour la recherche des facteurs d'interférence

Produit	N° lot	Solution	Diluant	Dilution	Concentration en endotoxine	Nombre d'exemplaire
NaCl (M.P).	Lot N° : 17BP151	A	_	_	_	4
		B	Solution à examiner	1/2 ; 1/3 ; ¼	2ʎ ʎ ʎ/2 ʎ/4	4 4 4 4
		C	Eau EEB	_	2ʎ ʎ ʎ/2 ʎ/4	2 2 2 2
		D	_	_	_	2
NaCl (P.F).	Lot N° : 001	A	_	_	_	4
		B	Solution à examiner	1/2 ; 1/3 ; ¼	2ʎ ʎ ʎ/2 ʎ/4	4 4 4 4
		C	Eau EEB		2ʎ ʎ ʎ/2 ʎ/4	4 4 4 4
		D	_	_	_	2

A : Solution de la préparation à examiner ne contenant pas d'endotoxine détectable (néant/solution à examiner).

B : Solution de contrôle d'interférence (2ʎ / Solution à examiner).

C : Témoin pour la sensibilité déclarée du lysat.

D : Témoin négatif (Eau EEB).

.

<u>Critère d'acceptation</u> :L test est valide si :

●Les solutions A et D ne montrent aucune réaction positive et si le résultat obtenu avec la solution C confirme la sensibilité su lysat.

●La sensibilité du lysat déterminée avec la solution B n'est ni inferieure à 0.5ʎ, ni supérieure à 2ʎ, la solution d'échantillon à examiner ne contient pas de facteurs d'interférences dans les conditions expérimentales utilisées, après le calcul de la valeur de la moyenne des logarithmes des concentrations au point final de la plus faible concentration qui donne un résultat positif, puis l'antilogarithme de la valeur moyenne pour toutes les dilutions expérimentées.

2.3. Essai limite

Cet essai permet avec un niveau d'assurance acceptable, de prouver qu'un échantillon contient ou ne contient pas une teneur en endotoxine supérieur à la limite spécifiée en endotoxines par la formation de gel.

Pour cela nous avons préparé les solutions A, B, C et D indiqués dans **(Tableau VIII).** Dans chaque tube des solutions A, B, C et D, un volume de 0.1mL du lysat est ajouté dans tous les tubes.

Tableau VIII : Préparation des solutions pour l'essai limite.

Solution	Concentration en endotoxine/ à laquelle dont ajoutée les endotoxines	Nombre d'exemplaire
A	Néant/ Solution à examiner diluée	2
B	2ʎ/ Solution à examiner diluée	2
C	2ʎ / Eau EEB	2
D	Néant/ Eau EEB	2
A et B :Solutions qui doivent être préparées en utilisant une dilution inferieure ou égale à la DMS (à partir de 1/20 pour la M.P et 1/10 pour le P.F).		

B et C : Solutions contenant l'étalon d'endotoxines à une concentration équivalente à 2ʎ
D : Témoin négatif, est constitué d'eau EEB.

<u>Critère d'acceptation</u> : l'essai n'est valable que si :

●Chacun des exemplaires des solutions B et C sont positifs et les 2 résultats obtenus avec la solution D est négatifs.

●Les deux résultats obtenus avec la solution A sont négatifs.

3.2 Expression des résultats :

La lecture principale commune des résultats des différentes étapes de cet essai se fait après incubation du mélange réactionnel pendant une période de 60 ±2 min à 37± 2 °C. Les résultats sont exprimés comme des résultats qualitatifs basés sur la présence ou l'absence de formation de gel. La formation d'un gel ferme et qui reste en place lors d'inversion à 180°, est enregistrée comme un résultat positif, qui contient des endotoxines. L'absence de formation de gel ou la formation d'une masse visqueuse qui ne tient pas lorsque le tube est inversé, est enregistré comme un résultat négatif, dont chaque essai a un critère d'acceptation spécifique.

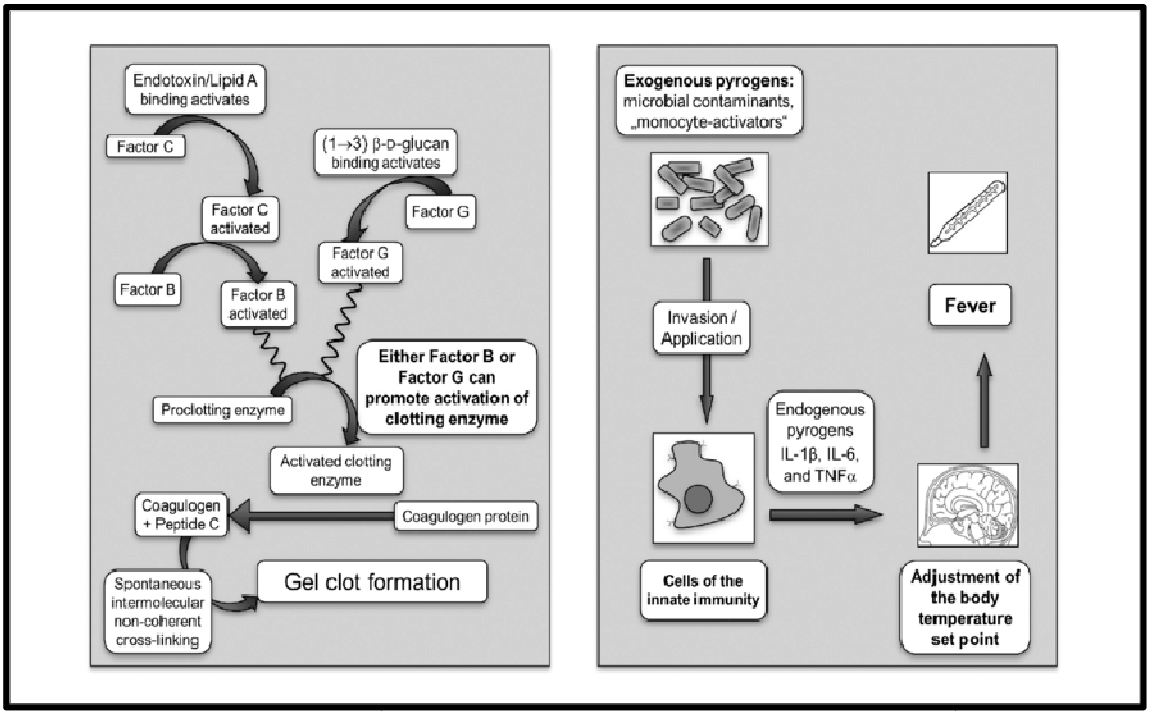


Figure 10 : Principe de réaction des endotoxines bactériennes in vivo (RPT) et in vitro (LAL)

Partie III

Résultats et discussion

I. Test pyrogène de lapin « *in vivo* »

1. Mesure de température initiale :

Le RPT a été réalisé selon les procédures suivant les instructions de Ph. Eu. En bref, la première température corporelle a été prise comme la température corporelle normale des lapins. La solution physiologique préliminaire a été injectée dans les 15 minutes après la température normale du corps a été mesurée. Puis la température du corps a été mesurée toutes les 30 min et mesurée 6 fois.

Tableau IX : sélection des lapins selon leur température initiale.

Sonde N°	Lapin N°	Poids Kg	Tm Initial	T = 0-15	T= 15-30	T = 30-45	T = 45-60	T = 60-75	T = 75-90
01	**01**	**3.1**	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4
02	**02**	**2.75**	39.4	39.4	39.2	39.2	39.2	39.2	39.2
03	**03**	**3.0**	39.3	39.3	39.3	39.4	39.3	39.3	39.3
04	**04**	**3.0**	39.7	39.5	39.5	38.7	38.8	38.8	38.8
05	**05**	**3.0**	39.3	39.5	39.6	39.5	39.7	39.7	39.7
06	**06**	**3.1**	39.3	39.3	39.2	39.3	39.3	39.3	39.3
07	**07**	**2.97**	38.7	38.5	38.3	38.7	38.5	38.8	38.8
08	**08**	**3.0**	39.1	39.3	39.4	39.5	39.5	39.6	39.6
09	**09**	**3.1**	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4

- **Interprétation des résultats**

La mesure initiale des températures des lapins au laboratoire est comprise entre (38.7 et 39.4). ce qui nous a affirmé que les lapins à essai sont satisfaits au système d'adaptation approprié, aussi à l'injection préliminaire de solution apyrogène Chlorure de sodium R 9g/L, solution physiologique nécessaire pour scruter l'état physiologique et immunologique avant l'examen initial, dont la variation de leur température corporelle satisfait à l'essai puisque elle n'a pas dépassé 0.6°C pour chaque lapin injecté. Ceci nous permet donc d'effectuer le test de pyrogénicité conformément et voir si la solution NaCl (M.P et P.F) est contaminée par des substances pyrogènes.

2. Mesure de température après injection de NaCl :

La mesure de la température après injection du NaCl (M.P) au premier lot (Lapins 01, 02 et 03) et NaCl (P.F) au troisième (Lapins 06, 07, 09) pendant 3 heures **(Annexe 04),** nos résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau X : Résultats de température après injection de produit à examiner NaCl.

	Lot 01 : NaCl (M.P)			**Lot 02 : Témoin**			**Lot 03 : NaCl (P.F)**		
N° : lapin	**01**	**02**	**03**	**04**	**05**	**06**	**07**	**08**	**09**
N° : Sonde	**01**	**02**	**03**	**04**	**05**	**06**	**07**	**08**	**09**
T initiale	39.4	39.2	39.2	/	/	/	38.7	39.6	39.4
T max	39.4	39.3	39.3	/	/	/	38.9	39.7	39.5
Δ T	+0.0	+0.2	+0.0	/	/	/	+0.2	+0.1	+0.1
∑ΔT	0.0 + 0.1 + 0.1 = 0.2			/			0.2 + 0.1 + 0.1 = 0.4		

- **Expression des résultats**

La lecture des résultats se base sur la détermination des températures initiales et maximales. La température initiale de chaque lapin est la moyenne de 2 valeurs déterminées à un intervalle de 30 min dans les 40 min précédant l'injection de NaCl (M.P et P.F) ; la température maximale est la température la plus élevée notée dans les 3h suivant l'injection de la même solution.

- **Interprétation des résultats**

Selon nos résultats obtenus, la solution effectuée d'abord sur un 1 lot de 3 lapins de M.P et 1 lot de 3 lapins de P.F satisfait à l'essai, car la réponse de l'animal (Lapin) est définie par la différence entre la température maximale et la température initiale moyenne de chaque lapins, dont les lapins d'un même lot n'ont pas accusé une variation de température supérieure à 0.6°C. De plus la somme des réponses dans chaque lot de 3 lapins ne dépasse pas une température de 1.15°C **(Annexe 05).** Ceci peut se traduire sur le plan physiologiquement que les lapins à essai après l'injection n'ont pas développé une réaction immunitaire, où la fièvre soit le premier indicateur d'une infection par substances pyrogènes **(Lewis Thomas. 1985)**.

En conclusion, l'échantillon de NaCl analysé par le test pyrogène de lapin est apyrogène, c'est-à-dire qu'il ne contient pas de substances pyrogènes qui peuvent détériorer le produit.

Figure 11 : Variation de température entre la température initiale et la la température maximale du lot (1).

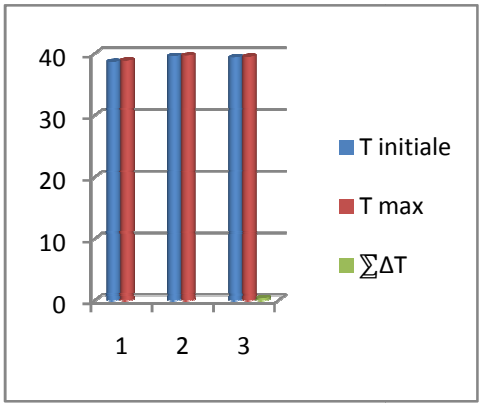
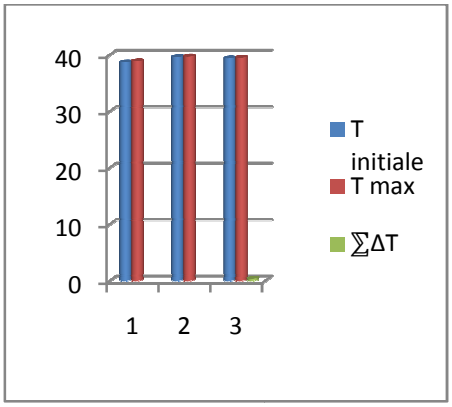


Figure 12 : Variation de température entre la température initiale et la la température maximale du lot (1).



II. Test LAL « *in vitro* »

1. Précaution de réalisation de l'essai

► Test de stérilité.

Tout le matériel utilisé entrant en contact avec les échantillons ou les étalons est exempt d'endotoxines bactériennes. Les conditions de conservation des produits à valider sont bien respectées. L'essai doit être effectué dans des conditions permettant d'éviter la contamination microbienne, aucune souillure n'est tolérée. Donc nous pouvons utiliser la paillasse pour procéder à l'essai des endotoxines bactériennes.

2. Qualification initiale de l'EEB (contrôle préliminaire)

2.1. Qualification initiale (Conformité de la sensibilité du Lysat)

► Préparation de l'endotoxine de contrôle (CSE)

La reconstitution du flacon d'endotoxine étalon par 7.5 mL d'eau EEB et l'agitation de cette solution pendant exactement dix minutes pour obtenir pour préparer la gamme d'étalonnage**(Annexe 03)**comme indiqué dans **(Tableau VI)** dans le but de tester la sensibilité du lysat **(Tableau X).**

Tableau XI: Résultat de l'essai au point final

	Concentration en endotoxine (UE/mL)					**Témoin négatif Eau EEB**
Exemplaire	**2ʎ 0.25 UE/mL.**	**ʎ 0.125 UE/mL.**	**ʎ/2 0.062 UE/mL.**	**ʎ/4 0.031 UE/mL.**	Point final	_
1	+	+	+	_	0.06	_
2	+	+	_	_	0.125	_
3	+	+	_	_	0.125	_
4	+	+	+	_	0.06	_

Lecture : le ++ ou - montre les résultats obtenus,
+ signifie positif (formation de gel).

- moins signifie négatif (Absence de formation de gel).
Bleu : les points finaux de formation de gel.

- **Expression des résultats**

●Point finale

La conformité de la sensibilité du lysat est définie par le terme de point final, c'est la plus faible concentration d'endotoxine que le lysat peut détecter et donner un résultat positif dans une série de concentrations décroissantes d'endotoxine standard.

●Calcul de la sensibilité expérimentale du lysat (λ) :

Le calcul de la sensibilité est réalisé par la détermination des points finaux à partir de l'essai effectué **(Tableau X)** puis le calcul de la moyenne géométrique des logarithmes à base 10 des points finaux ainsi obtenues présenté dans le tableau ci-dessous.

Tableau XII : Calcul de la sensibilité expérimentale.

Séries	Point final	Log 10 (Point final	Moyenne	Sensibilité expérimentale
1	0.06	-1.222	**$\overline{(X)}$ = -1.0625**	**E = 0.0865 UE/mL.**
2	0.125	-0.903		
3	0.125	-0.903		
4	0.06	-1.222		

- **Interprétation des résultats**

D’après nos résultats obtenus, la qualification initiale est bien valide, et le test de sensibilité est donc confirmé, dont la valeur mesurée de la sensibilité du lysat nécessaire à la recherche des endotoxines bactériennes est bien comprise dans l’intervalle recommandé par la Ph. Eu et mentionnée par le certificat d’analyse fourni par le laboratoire : [0.5ʎ _ 2ʎ]**(Ph. Eu 9.0. 2017)** La valeur ainsi obtenue dans notre expérience est de 0,06EU/mL< 0.0865EU/mL< 0,25EU/mL, dont la sensibilité établie dans le certificat d’analyse mentionnée avec ʎ = 0.125EU/mL. Cela nous confirme que la valeur est dans la limite d’acceptabilité de la sensibilité du lysat, ceci explique le phénomène de réaction enzymatique de l’endotoxine avec le LAL.

Sur le plan chimique, l’endotoxine induit la réaction de gélification du coagulogène du LAL sous forme de coaguline (enzyme responsable de le formation de gel). La réaction est une cascade de réaction enzymatique, qui nécessite la présence de plusieurs facteurs protéiques qui s’active les uns après les autres, le premier est induit par le L’endotoxine et plus précisément le lipide A qui se fixe au facteur C, puis sa forme active convertit le facteur B inactif en facteur B actif qui agit sur la préenzyme pour transformer le coagulogène en coaguline sous forme de gel **(Morita T et *al.*, 1985).**

Enfin d’après nos résultats obtenus, on confirme la sensibilité du lysat qui est éligible aux tests de toxines bactériennes internes et confère aux tests de routines **(Ph. Eu. 2017. 9.0).**

Le CSE utilisé dans le but de montrer la sensibilité du lysat, est calibré selon la recommandation de la Food Drug Administration et les pharmacopées internationales pour les fournisseurs du test LAL a partir de (RSE). L'absence de substances interférant avec le dosage a été démontrée par une récupération de pic acceptable dans la gamme de 50% à 200% selon l’exigence de la Pharmacopée Européenne **(SANOFI PASTEUR).**

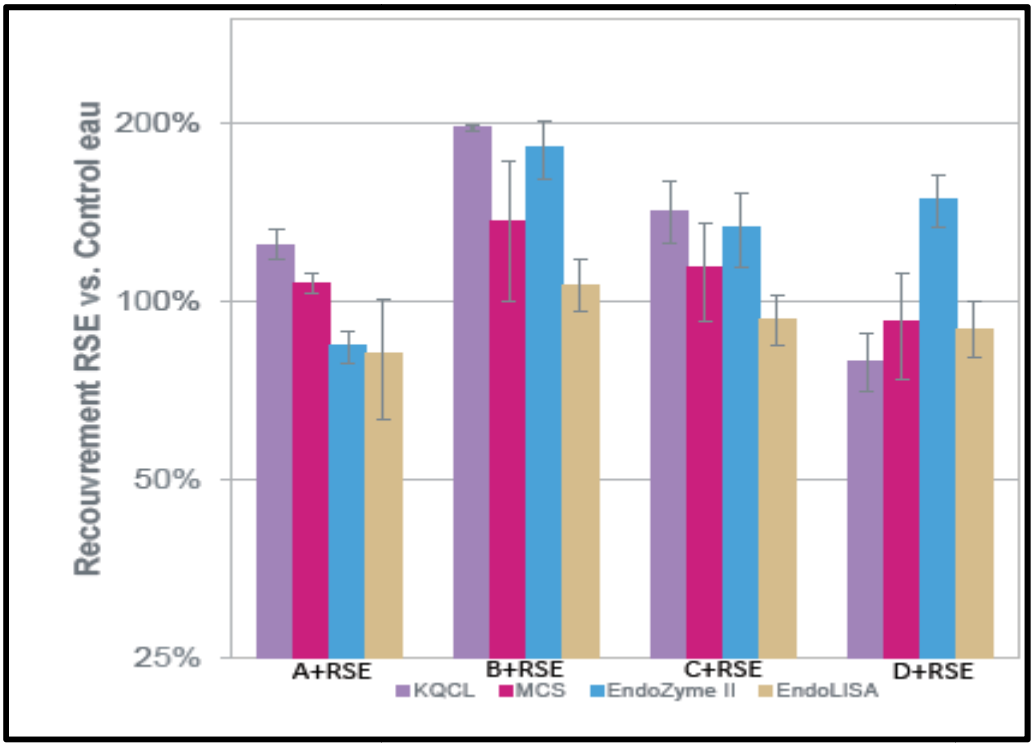


Figure 13 : Recouvrement de la RSE valide

2.2. Essai de recherche des interférences

La validation du test LAL, également appelée test d'inhibition et d'activation ou essai de recherche des interférences, doit être effectuée pour chaque formulation de médicament afin de déterminer le degré d'inhibition ou d'activation du produit. Pour cela la préparation d'échantillon doit convenir à la détermination de la limite en endotoxine et au calculer de la DMS qui indique à quel point le produit peut être dilué pour effectuer l'analyse conformément.

L'objectif de cette recherche d'interférences indiquée dans le **(Tableau VII)** est de déterminer la concentration du NaCl (M.P et P.F) pour que la sensibilité de la méthode dans le produit soit égale à la sensibilité de la méthode dans l'eau. Les interférences sont dues parfois à la haute sensibilité du lysat (0,25 EU/ml) **(Institut Pasteur 2002).**

La concentration de notre produit NaCl est déterminée à partir du calcul de la DMS, à laquelle la limite en endotoxine est déterminée **(Tableau V) et** nos résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau XIII : Résultats de recherche des facteurs d'interférence.

Témoin					Recherche d'interférence dans la solution B			
Produit	N° lot	Solution	Résultat 2ʎ ʎ ʎ/2 ʎ/4	N° de tubes	Solution	Dilution	Résultat 2ʎ ʎ ʎ/2 ʎ/4	N0 de tubes
NaCl M.P	17BP151	A	_	1 2 3 4	B (M.P)	1/4	+ + + – + + – – + + – – + + – –	1 2 3 4
		C	+ + – – – – + +	1 2		1/3	+ – + + + – + + + – – – – + – –	1 2 3 4
		D	_	1 2		½	– – – – – – – – – – – – – – – –	1 2 3 4
NaCl M.P	001	A	_	1 2 3 4	B (P.F)	1/4	+ + + – + + – – + + – – + + – –	1 2 3 4
		C	+ + — – – + +	1 2		1/3	+ – – + + – + + + – – + – + – –	1 2 3 4
		D	_	1 2		½	– – – – – – – – – – – – – – – –	1 2 3 4

+ signifie positif, - signifie négatif.
Le ++++ ou ---- montre les résultats pour quatre tests parallèles.
le ++ ou - - montre les résultats pour deux tests parallèles.
Bleu : Les points finaux de formation de gel

➢ **Expression des résultats.**

● La lecture des résultats se base sur la détermination de chaque série de concentration minimale d'endotoxine donnant un résultat positif, c'est le point final de solution B. Puis les mêmes calculs que précédemment.

● Pour les solutions A, D sont des solutions de témoin. La solution A et D ne doivent donner aucune réaction positive et que la solution C confirme la sensibilité du lysat dans l'eau EEB.

Tableau XIV : Calcul des sensibilités expérimentales

	Série	Point final	Log 10 (Point final)	Moyenne	Sensibilité
	Eau EEB	0.25	-0.602	**-0.602**	**λ_{eau} =0.25**
		0.25	-0.602		
Solution B (M.P)	Dilution 1/4	0.125	-0.903	**-0.982**	**λ = 0.104**
		0.125	-0.903		
		0.125	-0.903		
		0.06	-1.222		
	Dilution 1/3	0.06	-1.222	**-1.372**	**λ = 0.042**
		0.06	-1.222		
		0.03	-1.522		
		0.03	-1.522		
	Dilution 1/2	/	/	**/**	**/**
Solution B' (P.F)	Dilution 1/4	0.125	-0.903	**-0.982**	**λ = 0.104**
		0.125	-0.903		
		0.125	-0.903		
		0.06	-1.222		
	Dilution 1/3	0.06	-1.222	**-1.447**	**λ = 0.035**
		0.03	-1.522		
		0.03	-1.522		
		0.03	-1.522		
	Dilution 1/2	/	/	**/**	**/**

- **Interprétation des résultats.**

Lorsque la récupération de l'endotoxine est en dehors de la plage spécifiée, la solution échantillon testée est considérée comme contenant des facteurs d'interférence

D’après nos résultats, les sensibilités expérimentales déterminées pour la solution B et B’ à une dilution de 1/4 de NaCl (M.P) et (P.F) et la sensibilité du lysat dans l’eau EEB sont bien comprises dans l’intervalle fixé selon la Ph. Eu : $\lambda/2 \leq \lambda \exp \leq 2\lambda$, dans les valeurs obtenues sont :

1) Eau EEB : 0,25UE/mL= 0.25UE/mL<0.06 UE/mL.
2) Solution B NaCl (M.P) : 0,25UE/mL. ≤ 0.104UE/mL. ≤ 0,06 UE/mL.
3) Solution B’ NaCl (P.F) : 0,25UE/mL. ≤ 0.104 UE/mL.≤ 0,06 UE/mL.

Comme les sensibilités expérimentales « lysat – eau » et « lysat –solution B et B’ à une dilution 1/4» sont comprises dans l’intervalle [2ʎ , ʎ/2], donc le produit examiné n’interfère pas dans la réaction « LAL – endotoxine » et peut être donc dosé en routine à la dilution utilisée dans ce test. En revanche, à une dilution (1/3) mL, des deux solutions analysées ont donné des résultats non comprises dans l’intervalle fixé, dont les valeurs obtenues sont : une sensibilité de 0.042UE/mL (solution B M.P) et 0.03 UE/mL (Solution B’ P.F) qui sont inferieures à 0.5ʎ. A une dilution (1/2)mL les résultats étaient tous négatifs « pas de point final », ceci explique que le produit interfère la réaction « LAL – endotoxine » et donc à ces dilution le produit analysé ne peut jamais être dosé en routine à la dilution utilisée dans le test **(Ph. Eu, 2017 9.0)**.

Selon la fiche technique de Chlorure de Sodium, les dilutions effectuées lors du test de recherche préliminaire doivent être croissante à partir de 1/1, 1/2, 1/3, 1/4……jusqu’au 1/10 pour la P.F et jusqu’au 1/20 pour le M.P qans le but de trouver la concentration minimale du produit sensible au réactif LAL. Pour les tests de routine sur ce produit, il est judicieux de diluer les solutions à une dilution minimale inferieure de la DMS et à chaque fois si la préparation testée n'est pas conforme, l'essai doit être répété en utilisant une dilution supérieure, ne dépassant pas la DMS **(Munson TE. 1985).** Effectivement d’après nos résultats le produit est inhibiteur à une dilution de 1/2 et le test d’inhibition activation est donc réalisé au 1/4 et donne un résultat conforme **(Ph. Eu, 2017 9.0).**

Bien que la plupart des médicaments parentéraux montrent une inhibition ou activation en pratique, ce test peut être efficacement effectué plus facilement en éliminant les facteurs d‘interférences par dilution de notre échantillon à une dilution ne dépassent pas la DMS ni trop inferieure à la DMS pour que l’extrait enzymatique de LAL et l’endotoxine n’échappent pas à la réaction enzymatique **(Das AP. 2014),** car plus on dilue l’échantillon, plus l’interférence sera diminué, mais en même temps la concentration endotoxine diminue

également. Pour cette raison, il ne faut pas trop diluer l'échantillon si non une faible concentration d'endotoxine risque échapper à la réaction enzymatique ce qui pourrait être à l'origine d'un résultat faux négatif. **(ICH guideline Q4B).**

La réaction du lysat est une cascade enzymatique très sensible à beaucoup d'éléments chimiques et biologiques. Sur le plan chimique, le risque d'interférence est soit inhibiteurs soit activateurs. Les inhibiteurs sont pH, chélation des cations divalents, modification protéique ou enzymatique…etc.

2.2.1. Interférence liée au pH

Le pH idéal pour la réaction LAL doit être entre 6 et 8, cette notion pour le pH dans le milieu réactionnel, produit + lysat et l'inhibition n'est constatée que si «produit + Lysat» a un pH <6 ou >8. Si le pH est inferieur ou supérieur à cette valeur le lysat peut empêcher la formation de gel en présence d'endotoxine. Il est aussi recommandé par la Ph. Eu de s'assurer de la plage du pH du produit de sorte qu'il soit ente 6 et 8, car même la résolution par le tampon du lysat, il en doute de détériorer la réaction enzymatique **(Galanos et *al*., 1972).**

2.2.2. Interférence liée à la chélations de cations bivalents

La réaction LAL est une réaction enzymatique qui possède des exigences particulières concernant la nature et la concentration des sels et des cations divalents qui doivent être présents dans un milieu réactionnel. Si ces conditions ne sont pas respectées la réaction ne va pas être optimale et le dosage devient alors imprécis voire parfois impossible **(Cooper J. 1991)**

La présence de cations bivalents comme le Ca++ou Mg++ peuvent également engendrer une inhibition. Les cations sont attirés par la charge négative de l'endotoxine ce qui engendre l'augmentation de la taille des agrégats d'endotoxines et diminution de leur activité. Les cations divalents peuvent encore augmenter l'agrégation en liant les sous-unités d'endotoxines par liaison ionique.

2.2.3. Interférences liées aux activateurs

Les activateurs comme activation du facteur C par des éléments autre que le LPS et activation par le Glucane causent un problème majeur et provoquant des résultats faussement positifs ou négatifs **(Dobrovolskaia MA. 2013)**.Dans ce cas la résolution ne peut être effectué que par le fabricant du lysat.

◙ **Activation par (1-3) β Glucane**

Le (1-3) β-D Glucane sont des polymères de D glucose entrainants une entrant dans la composition de la paroi cellulaire des levures et moisissures, sont également présent dans le périplasme de certaines bactéries. Il ils sont présents dans le milieu réactionnel, ils sont susceptible de déclencher la réaction du LAL par l'intermédiaire de la voie du facteur G et d'entrainer une surestimation de la concentration en endotoxine **(Roslansky P. 1991).** Cependant la laminaire est une substance capable de bloquer la voie du facteur G activé par les Glucanes **(Yokota H. 2001)** et les fournisseurs proposent un tampon bloquant la voie G.

Contrairement aux inhibiteurs qui peuvent être résolu par une dilution par eau EEB et dilution supplémentaire respectant la DMS et la limite en endotoxine au laboratoire, les inhibiteurs sont nombreux comme « SDS, urée, pénicilline G…etc. » **(Figure 10) (Sullivan J. 1976).**

Une meilleure compréhension de la natures des interférences du test LAL, est l'utilisation de la dilution admissible minimise les problèmes d'inhibition. Les facteurs d'interférences incluent le ph, les protéines modifiant la réaction du LAL, la charge cationique et autres. La dilution est la meilleure approche pour résoudre les interférences, car plus de 90% sont dépendant de la concentration et sont résolues avec une dilution appropriées à la DMS **(Cooper J. 1990).**

Les activateurs, comme activation du facteur C par des éléments autre que le LPS et activation par le Glucane causent un problème majeur et provoquant des résultats faussement positifs ou négatifs **(Dobrovolskaia MA. 2013)**.Dans ce cas la résolution ne peut être effectué que par le fabricant du lysat.

Tableau XV: les facteurs agissants et interférents investissant dans la réaction LAL.

Paramètres	Effets sur la réaction LAL	Valeur de référence
Température	Contrôle de la cascade des réactions enzymatiques	*Réaction :* *- Optimale pour 36°C< T°<38°C* *- Nulle si 25°C<T°>45°C*
pH	Contrôle de la cascade des réactions enzymatiques	*Réaction optimale si 6.4<pH<8*
Cations		
Ca^{2+}	Interviennent dans la réaction enzymatique et la conformation des molécules d'endotoxines	*Réaction :* *- Optimale pour 25ppm< $[Ca^{2+}]$<50 ppm* *- Inhibée si $[Ca^{2+}]$>250 ppm*
Mg^{2+}		*Réaction :* *- Inhibée pour 25ppm< $[Mg^{2+}]$<50 ppm* *- Optimale pour $[Mg^{2+}]$>50 ppm*
Na^{+}		
SDS	Inhibe la réaction en dénaturant les protéines	*Inhibition sensible à 0.01 %* *Inhibition sensible à 0.1 %*
Urée	Inhibe la réaction en dénaturant les protéines	*Fortement inhibiteur*
EDTA	Inhibe la réaction en modifiant la structure des LPS Agit également comme agent chélateur des ions	*Réaction :* *- Non inhibée $[EDTA]=10^{-3}$ M* *- Inhibée pour $[Mg^{2+}]=10^{-2}$ M*
Citrate de Na	Inhibe la réaction LAL par un mécanisme inconnu	*Fortement inhibiteur à 100m/l*
Glycine		
Pénicilline G	Inhibe la réaction LAL par un mécanisme inconnu	*Agit à partir de 20 mg/l mais variable en fonction de la structure du LPS*
Polymixin B	Inhibe la réaction LAL par un mécanisme inconnu	

3. Essai limite

L'essai limite également appelé l'essai des endotoxines par la méthode LAL, la validation de cette méthode repose sur des points critiques indispensables pour prouver si un échantillon contient ou non une teneur en endotoxine supérieure à la limite spécifiée, pour cela nous avons préparé les solutions A, B, C et D comme indiqué dans **(Tableau VIII).**

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau XVI : Résultat de l'essai limite obtenus pour le NaCl (M.P)

N° d'exemplaire	Solution d'échantillon NaCl (M.P)	Solution d'échantillon NaCl (M.P) + 2ʎ	Eau pour EEB + 2ʎ	Eau pour EEB
1	–	+	+	–
2	–	+	+	–

Tableau XVII : Résultat de l'essai limite obtenus pour le NaCl (P.F).

N° d'exemplaire	Solution d'échantillon NaCl (P.F)	Solution d'échantillon NaCl (P.F) + 2ʎ	Eau pour EEB + 2ʎ	Eau pour EEB
1	–	+	+	–
2	–	+	+	–

- **Interprétation des résultats :**

●Le contrôle négatif d'eau EEB ne forme pas de gel, la réaction est négative, ainsi que le contrôle positif eau EEB donne un résultat positif c'est à dire un gel ferme tenant au fond du tube, ceci explique que la sensibilité du lysat est déclarée pour effectuer le test de routine **(Ph. EU .2017 9.0)**

●Le tube dosage de solution NaCl (M.P et P.F) est négatif, c'est-à-dire que le produit testé renferme une teneur en endotoxine moins de 5UE/g tant pour la M.P et 3.6 UE/mL pour le produit fini. Les contrôles positifs de la solution NaCl (M.P et P.F) donnent des résultats positifs, cela confirme l'activité du lysat à détecter l'endotoxine dans les conditions de l'essai.

Le lysat est sensible en terme de conditions complètes ; d'un agencement logique de la présence l'échantillon à tester et le CSE avec une dilution inferieure ou égale à la DMS et de la sensibilité déclarée a partir de 2ʎ **(Ph. Eu, 2017 9.0).**

Le produit NaCl répond aux exigences des pharmacopée concernant le test des endotoxines bactériennes par la technique de gélification (Méthode A) Les directrices pour la validation des méthodes biologiques (**Ramond B et *al.*, 2002)** pour le dosage qui est un essai limite montre que l'évaluation des critères de spécificité et la teneur en endotoxine est respectée.

La détection des endotoxines produites par les bactéries Gram négatives, se fait au moyen d'un lysat d'amoebocytes de limule. La méthode par gélification de l'essai de recherche des endotoxines bactériennes est de fait spécifique ; et la teneur en endotoxine est inferieure à sa limite 5 UE/dose **(Ph. Eu, 2017. 9.0).**
En conclusion nous pouvons dire que la méthode par gélification est fiable et valide.

Selon le SRT N°872 de l'OMS **(WHO. 1999)** l'essai des endotoxines bactériennes est l'une des étapes du contrôle qualité des vaccins sur le produit final vrac et le produit fini. Deux types de test sont utilisés pour le dosage des endotoxines :

●Test in vivo. : Essai de recherche des substances pyrogènes chez le lapin. Dans un passé très récent, c'était l'unique test utilisé pour la recherche des pyrogènes dans les solutions parentérales et les dispositifs médicaux.

●Test in vitro.
Essai des endotoxines bactériennes utilisant comme réactif le lysat d'amoebocytes de limule(LAL).

Dans notre étude nous avons utilisé un test in vitro (méthode LAL). Comparativement à la méthode et du test pyrogène chez le lapin in vitro et d'après nos résultats on estime que le test LAL est plus sensible à la détection des endotoxines bactériennes que le test pyrogène de lapin, car le test LAL est spécifique à la détection des endotoxines bactériennes dont la réalisation nécessite une petite quantité du produit à analyser, Un faible niveau d'endotoxine peut être mieux détecté avec le test LAL qu'avec l'essai des pyrogènes sur le lapin**,** le LAL est économique et standardisé et nécessite un seul manipulateur. Contrairement au test pyrogène de lapin qui présente l'avantage de détection de toutes les substances pyrogènes que les endotoxines bactériennes, en parallèle certains inconvénient ont été remarqués comme : La répétition du test entraîne l'utilisation d'un nombre important d'animaux ; les conditions dans lesquelles sont les lapins et le stress influent sur les résultats et les lapins ont

besoin d'être préparés pour le test, ils doivent s'adapter au nouvel environnement et aux manipulations (**Blechova R et *al*., 2001)**

Nos résultats sont corroborés par **BLECHOVA** et **PIVODOVA, 2001** qui ont fait une étude comparative de la méthode LAL et du test pyrogène chez le lapin **(Blechova R et *al*., 2001)**. Ils ont évalués les deux tests (tirés les avantages et les inconvénients).

- **Evaluation du test pyrogène chez le lapin**

●L'avantage de ce test in vivo est la possibilité de détecter d'autres substances pyrogènes que les endotoxines. Ceci est important pour le contrôle qualité des préparations pour usage parentéral.

● Les inconvénients de ce test sont :

► La sensibilité insuffisante des lapins pour la détection de la présence d'endotoxines, spécialement dans les produits à utilisation intraveineuse, dans l'eau pour les bébés et dans les produits ayant une concentration limite en endotoxines (ELC) basse

► La réaction d'hyperthermie (élévation de la température corporelle) n'est pas très précise ;

► La répétition du test entraîne l'utilisation d'un nombre important d'animaux ;

► Les conditions dans lesquelles sont les lapins et le stress influent sur les résultats. Les lapins ont besoin d'être préparés pour le test, ils doivent s'adapter au nouvel environnement et aux manipulations ;

► On ne peut pas tester simultanément un groupe important d'animaux (un test dure 72 heures avec trois lapins) ;

► Pour des raisons de sécurité il faut au moins deux manipulateurs ;

► Les tests avec les animaux sont évités pour des raisons d'éthique et en accord avec la « règle des 3 R » (raffinage, réduction, remplacement) **(Burch et *al*., 1992).**

- **Evaluation du test LAL**

D'après ces mêmes auteurs la méthode LAL ses avantages certains et quelques inconvénients :

Les avantages **(Blechova R et *al*., 2001)**.

- A juste besoin d'une petite quantité d'échantillon pour le test LAL.
- Plusieurs échantillons peuvent être testés le même jour.
- Un seul manipulateur peut mener à bien métriser le test.
- Le test LAL est économique.
- Un faible niveau d'endotoxine peut être mieux détecté avec le test LAL qu'avec l'essai des pyrogènes sur le lapin.
- Le test est standardisé.
- Les données pour l'évaluation finale du test peuvent être obtenues rapidement.

Les inconvénients sont :

- L'utilisation d'un matériel précis ;
- La moindre interférence peut influer sur le résultat du test.

L'étude comparative **BLECHOVA** et **PIVODOVA**, **2001** a conclue que l'essai des pyrogènes chez le lapin avait beaucoup de désavantages, et que le coût était particulièrement élevé par rapport au test LAL qui était plus sensible, plus précis, d'exécution facile et de moindre coût. De plus, plusieurs solutions parentérales qu'on ne pouvait pas soumettre à l'essai des pyrogènes chez le lapin pouvaient être testées avec le test LAL **(Blechova R et *al*., 2001)**.

Notre choix pour un test in vitro est ainsi justifié d'après la Pharmacopée Européenne, l'essai des endotoxines bactériennes peut être réalisé par technique de gélification (induction de la formation d'un gel) est donc valide et spécifique à la recherche des endotoxines bactériennes **(Ph. Eu, 2017 9.0).**

Conclusion

Notre étude qui porte sur une qualification initiale du test de recherche des endotoxines bactériennes par la technique de gélification (méthode A) pour le Chlorure de sodium (matière première) et le Chlorure de sodium hypertonique à 10% (produit fini) et qui a été réalisé au niveau du laboratoire Contrôle de Qualité SAIDAL a été entreprise dans l'objectif d'une qualification initiale d'un test de recherche des endotoxines bactériennes. Pour cette raison l'analyse a été effectuée en utilisant deux tests de recherche des endotoxines bactériennes sur deux lots de produit à usage parentéral NaCl comme étant matière première pour la production des médicaments injectables et NaCl hypertonique à10% SAIDAL. Il s'agit du test pyrogène de lapin « test *in vivo* » et le test lysat amoebocytes des limules (LAL) « test *in vitro* ».

L'analyse *in vivo*, effectuée sur une population de 09 lapins, a montré que la variation thermique relative est minime entre les températures initiales et les températures maximales enregistrées. Ces résultats confirment que les produits analysés sont exempts de substances pyrogènes telles que les endotoxines.

L'analyse *in vitro*, nous a permis de qualifier le test de recherche des endotoxines bactériennes comme un test alternatif remplaçant le test pyrogène de lapin. Cette méthode repose sur la propriété que possède le lysat d'entraîner la formation d'un gel solide lorsqu'il est mélangé avec une solution contenant des endotoxines bactériennes.

La validation de l'essai est dépendante de :

● Une qualification initiale qui nous a permis de confirmer la sensibilité ʎ du lysat déclarée nécessaire à la recherche des endotoxines bactériennes en montrant que la sensibilité expérimentale était comprise dans l'intervalle [ʎ /2 - 2 ʎ].

● Un essai recherche des interférences sur les deux lots de NaCl, a montré qu'il n'y avait pas d'interférences entre le NaCl et la réaction« LAL – endotoxine », les sensibilités expérimentales des deux lots NaCl étant comprises dans l'intervalle [ʎ /2 - 2 ʎ].

Les valeurs des critères de validation mettent en évidence la spécificité du test aux endotoxines.

En complément de la validation, nous avons procédé à un essai de routine ou essai limite qui a démontré que :

●Les témoins négatifs sont non gélifiés.

●Les contrôles positifs de NaCl à 2 ʎ (PPC) sont gélifiés.

●Les tubes de dosage NaCl sont non gélifiés.

Pendant longtemps, le test pyrogène de lapin a été considéré comme l'unique test capable de détecter les substances pyrogènes tel que les plus puissants, endotoxines bactériennes. Mais dans le cadre dans notre étude nous avons pu montrer que le test LAL est un test spécifique et très sensible à la recherche des endotoxines et qui peut remplacer le test pyrogène de lapin.

Références Bibliographique

Références bibliographique

Abraham PR, van den Ende A & van Deventer SJ (2001). Distribution and kinetics of lipoproteinboundendotoxin.*Infect Immun***69,** 2821–2828.

AKERS MJ, **1984**,«pyrogen testing in parenteral quality control sterility, pyrogen, particule and package integrity testing ».Third Edition.

Alois NOWOTNY, John J. SPITZER et Elizabeth J. ZIEGLER, Cellular and Molecular Aspects of Endotoxin Research Series, vol. 1, sous la direction d'AloisNowotny, Elsevier Science Publishers, 1990 .

AMILABO, (Mai 1990) l'essai LAL et kle PH. LAL UPDATE .

AMILABO, (Aout 1990) le sang du crabe en fer a cheval. De la découverte a la commercialisation . LAL update.

AMILABO, (Mai 1989) inhibition \ activation LAL UPDATE.

Article du 9 juillet 2001 sur e-sante.frPhilippe Presles. Site internet

Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides : Vol. 1 : Molecular Biochemistry and cellular biology ; vol II : Immunopharmacology and pathophysiology. Sous la direction de David CC. Morrison et johnL.Ryan CRC press, 1992.

Bacterial Endotoxins Test, USP26 NF 21.2003.

Baines, A. (2000). "Endotoxin Testing" in Baird, R.M., Hodges, N.A. and Denyer, S.P. *Handbook of Microbiological Quality Control: Pharmaceuticals and Medical Devices*, Taylor and Francis: London, pp144-167

Bang F.B. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on Limulus and the formation of blood clots. Biol Bull (Woods Hole, MA) 105 : 361-362 .

Bellentani L. Cyclic chronobiological considerations when employing the rabbit fever test. Clinical and BiologicalResearch.1982; 93: 329–342.

Brandberg K, Seydel U, Schromm AB, Loppnow H, Kochm MHJ, Rietschel ET. Conformation of lipid A, the endotoxin center of bacterial lipopolysaccharide. J Endotoxin Res 1996; 3(3):173–8.

Bonenberger,Dickmann J, Fennrich W, Fischer S., Workshop on Paul Ehrlich Institute. 2001;7:525-533.

Brandberg, K. et al (1996): Conformation of lipid A. the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Endotoxin Research* 3:173-178

CoceaniF. Endothelin-induced constriction of the ductusvenosus in fetal sheep:developmental aspects and possible interaction with vasodilatory prostaglandin. Br J Pharmacol 142: 727-736, 2004.

Das AP, Kumar PS, Swain S. Recent advances in biosensor based endotoxin detection. BiosensBioelectron 2014;51:62– 75.

E. ThRIETSCHEL et al., Bacterial Endotoxin : Molecular Relationships between structure and Activity in infectious disease clinics of North America , numérospécial de Gram-Négative Septicemia and septic shock, vol.5, n 4, pp. 753-779 ; 1991.

Emst RIETSCHEL dirige l'institut de recherche Borsel ; en Allemagne, et enseigne la microbiologie a l'université médicale de Lubeck. Helmut BRADE est professeur assistant de microbiologie a l'institut Borsel .

Essai des endotoxines Bactériennes (chapitre 2.6.14 extrait de la pharmacopée européenne 9.0) .*Flammarion, Médecine - Sciences, Paris, 2017, p : 88 -178.*

FRIBERGER P, 1987, A new method of endotoxin determination. American clin.Products, p.12-17.

GALANOS C, LEHMANN V, LUDERTIZ O, RIETSCEL ET et al.- Endotoxicproprerties of chemicallysynthesizedlipid a part structures. Comparison of synthetic lipid Aprecursor and synthetic analogues with biosynthetic lipid A precursor and free lipid A. EUR J Biochem, 1984 : 140(2) : 221-27.

Gould, M. c. Endotoxin in vebrate cell cultures : its measurement and significance, p. 125-136. Dans : Uses and standarization of vertebrate cell cultures, in vitro monograph number 5, 1984. Tissue culture association ; Gaithersburg MD.

GREFF-MIRGUET.G. *Echantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air. Cahier de notesdocumentaires- hygiène et sécurité du travail- N°187.INRS, 2002, p : 73-8.*

Greisman S.E., Hornick ,R.B. Comparative pyrogenic reactivity of rabbit and man to bacterial endotoxin, Proceedings of the society of experimental biology and medicine. 1969;131: 1154-1158.

Guideline on validation of the limulus Amebocyte Lysate as an End-product Endotoxin Test for human and animal parenteral drugs, Biological Products, and MEDICAL DEVICES. US.Departement of health and human services, food and drug administration, December 1987.

Hecker, W, D Witthauer and A Staerk.Validation of dry heat inactivation of bacterial endotoxins, PDA J. Pharm. Sci.

Technol., 48:197, 1994

Howell, w. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of limulus polyphemus, callinecteshastatues, and cucumaria sp. Johns hopkinsuniversitycircular43 :4-5.

Hull D. Biology of the Neonate Age-related changes in endotoxin sensitivity and the febrile response of new born rabbits. Biol. Neonate 1993;63(6): 370–379.

Hull D,Mcintyre J, Vinter J. Age related changes in endotoxin sensitivity and the febrile response of new born rabbits. Biol Neonate 1993 63(6) 370-379.

ICH guideline Q4B, Annex 14 to note for Evaluation and Recommendation of pharmacopoeial Texts For Use in the ICH Regions on Bacterial Endotoxins Tests - General Chapter.

JOHNSON A., GAINES S. et al. *Studies on the O antigen of Salmonella typhosa V. Enhancement of antibodyresponse to protein antigens. By purified lipopolysaccharides.*

KADIS S., WEINENBAUM G. et al, 1971, Microbialtoxins, (5), bacterial endotoxins. Academic press, New york, pages 507.

Keith Esch R, Li H, Foarde KK, Ensor DS. Endotoxin contamination of engineered nanomaterials.Nanotoxicology 2010;4:73–83.

Khalik E.,.BendielA.F , Effects of weight and sex of rabbits on the results of testing of chorionic gonadotrophin injection according to europeanpharmacopoeia,Journal of pharmacy and pharmacology. 1982: 34: 209-210.

Kumar, H. (2007): „Variability in the Bacterial Endotoxin Test or LAL Test", *Endosafe Times*, Charles River Laboratories, USA

LANVIN G, 2002, Essai des endotoxines bactériennes. DESS Contrôle Qualité des produits de Santé – ULP Strasbourg. Aventis pharma, France, p.1-47. **.**

LAL Users Group. Preparation and use of endotoxin indicators for depyrogenation process studies, J. Parenteral Drug Assoc.,

LE HIR A, 1988, Evolution de la maîtrise qualité dans l'industrie du médicament. Conception moderne du contrôle. S.T.P Pharma Pratiques, p.44- 50.

LECLERE H., GAILLARD J.L et SIMONET M., 1995, Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien, Doin, Paris, P 505 et 507.

Lee J, Johnson J, Reynolds S, Thorne P, O'Shaughnessy P. Indoor and outdoor air quality assessment of four wastewater treatment plants. J Occup Environ Hyg2006 ; 3 : 36-43.

LEVIN J, 1987, The limulus amoebocyte lysate test perspectives and problems. Detection of bacterial endotoxines with the limulus amoebocytes lysate test.New York, Alan R Liss, p.1-23.

Levin, J., et F.B. Bang. 1964 .A description of cellular coagulation in the lumulus Bull. johns Hopkins Hosp. 115 :337-345.

Levin, J., et F.B.Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of limulusblood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115 :265-274.

Levin, J., etF.B.Bang. 1968. Clottableprotein in Limulus : its localisation and Kinetcs of its coagulation by endotoxin. Thromb.Diath.Haemorrh.19 :186-197.

Lindsay, G.K., Roslansky, P.F., and Novitsky , T.J. (1989).S ingle-step, chromogenic Limulus amebocyte lysate assay for endotoxin, *J ClinMicrobiol*. 27(5): 947–951.

Li Y, Boraschi D. Endotoxin contamination: A key element in the interpretation of nanosafety studies. Nanomedicine (Lond) 2016;11:269–87.

LOEB LEO Marine BiologicalLaboratory(MBL) 1902.

Marchand G. Les endotoxines en milieu de travail. Montréal : IRSST, 1996.

Martino TK, Hernández JM, Beldarraín T, Melo L. Identification of bacteria in water for pharmaceutical use. RevLatinoamMicrobiol 1998;40(3–4):142–50.

MATHIEU S., DEL CERRO C., NOTIS M-H, **1996**, Gérer et assurer la qualité, AFNOR, 6e édition, p.703.

McCullough, K.C. and Weider-Loeven, C. (1992): „Variability in the LAL Test: Comparison of Three Kinetic Methods for the Testing of Pharmaceutical Products", *Journal of Parenteral Science and Technology*, Vol. 44: 69-72

McCullough, K. (2008): Laboratory Variability, *LAL Users' Group Newsletter*, Issue 2, No. 3, p6-7

Moser, K. (2009): „Playing Hide and Seek with Endotoxin", *LAL User Group Newsletter*, Issue 3, Number 2, pp1-5

Morita, T., et al (1981) A new (1->3)-B-D-glucan mediated coagulation pathway found in Limulus amebocytes. FEBS letters, 129 :318-321.

MORITA, T., et al. (1985) Biochemical characterization of limulus clotting factors and inhibitors which interact with bacterial endotoxins. In Bacterial Endotoxins : structure, biomedical significance and detection with the limulus amebocyte test, 53-64, Alan R. LISS, inc.

MUTA, T., et al (1987) Primary structure of aniLPS factor from horseshoe crab hemocytes its activation by synthetic lipid A analogues and acid phospholipids . Eur. J.Biochem. 176 :89-94.

NAKAMURA, S., et al (1976) A clottable protein from amebocyte lysate of japanese horseshoe crab (Tt) its isolation and biochemical propreties. J. Biochem, 80 :1011-1021.

NAKAMURA, S., et al (1982) A clotting enzyme associated with the hemolymph coagulation system of horseshoe crab (Tt) : its purification and characterization. J.Biochem, 97 :781-792.

Nakata, T, Destruction of challenged endotoxin in a dry heat oven, PDA J. Pharm. Sci. Technol., 48:59, 1994.

Novitsky, T. J ; 1984. Discovery to commercialization : the blood of the horseshoe crab. Oceanus 27 :13-18.

Pardo-Ruiz Z, Menéndez-Sardiñas DE, Pacios-Michelena A, Gabilondo-Ramírez T, Montero Alejo V, Perdomo-Morales R. Soluble β-(1,3)-glucans enhance lps-induced response in the monocyte activation test, but inhibit lps-mediated febrile response in rabbits: Implications for pyrogenicity tests. Eur J Pharm Sci 2016;81:18–26.

Parenteral Drug Association, Inc.,Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985.

Pearson, F. C., Bohon, J., Lee, W., Bruszer, G., Sagona, M., Jakubowski, G., Dawe, R., Morrison, D., and DinareUo, C., (1984): "Characterization of Limulus Amoebocyte Lysate-Reactive Material from Hollow-Fiber Dialyzers," Appl. Environ. Microbiol. 48: 1189-1196

Pearson F.C. Pyrogens:Endotoxins, LAL testing and depyrogenation. 1985.

PETAT (E.) et col, 1996, Les méthodes alternatives de contrôle microbiologique. Présentation des principales techniques rapides. Rapport d'une commission SFSTP. STP Pharma Pratiques, p. 281-301.

PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 6.0 chapitre 5.1.4. Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques, p .567-569

Pivodovà. Belchovvà R.D.Limulus amoebocytes lysate (LAL) test – an alterbative method for detection of Bacterials Endotoxins. Acta vet. Brno 2001, 7: 291- 296

Progress in clinical and biological Research vol ; 231, Detection of bacterial Endotoxins wit the Limulus Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S, W., J. Levin et T.J. Novitsky (eds) , Alan R. Liss, Inc., NY.

Raetz C, Whitfield C, « Lipopolysaccharide endotoxins », *Annu Rev Biochem*, vol. 71, n° 1, 2002, p. 635–700

Raetz, Christian R. H.; Guan, Ziqiang; Ingram, Brian O.; Six, David A.; Song, Feng; Wang, Xiaoyuan; Zhao, Jinshi, « Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story », *Journal of Lipid Research*, 2009, S103–S108

RAMOND B., GAILLANDRE A, GIBELIN N., MAIGNAN C., NABET P. *Guide de validation des methodes de dosage biologique.STP Pharma Pratiques. 2002. p: 2-19.*

Recommandations en matière de techniques de stérilisation, **1993**, Conseil Supérieur d'Hygiène., nr°7848.

Recommandations pour la réalisations de l'essai des endotoxines Bactériennes(chapitre 5.1.10 extrait de la pharmacopée européenne 8.0) .

Richardson, K. and Novitsky, T.J. (2002): „Simple Statistics for the LAL User – Standard Deviation, Repeatability, Reproducibility and a Clarification of the Coefficient of Variation", *LAL Update*, Vol. 20, No.4

Rietschel et al The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity,Immunobiology .1993;187(3-5):169-90.

Snell JJS. Preservation of control strains. In: Snell JJS, Brown DFB, Roberts C, editors. Quality assurance: principles and practice in the microbiology laboratory. London: Public Health Laboratory Service; 1995. p. 69–76.

Sweet,B. H. et J. F. Huxosoll. Depyrogenation by dry heat, ch. 12, p. 101-108.Dans :depyrogenation, technical report NO. 7, 1985. Parental drug Association., Philadelphia, PA.

TANAKA, S et al. (1982) limulus antiLPSfactor : an anti coagulant with inibits the endotoxin mediates activation of limulus coagulation system .biochem. Biophys. Res. Commun. 195 :717-723.

Test for Endotoxins I. P. 2007; 1: 35.

TOKUNAGA, F. et al. (1987) Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor c) of horseshoe crab hemocytes.Eur.J.Biochem167 :405-416.

TSUCHIYA,M., et al . (1990) An Endotoxin specific assay by blocking new (1->3)-B-D-glucan mediated coagulation pathway in Limulus amebocytes lysate. In the first congress of the international endotoxin society. San Diego 1990.

Tsuji ; K. et S.J Harrison. 1987. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide : Dry-heat destruction Kinetics. Appl.Environmicrobiol. 36 : 715.

USP < 35 >chapitre85 .

U.S. Pharmacopeia 33 - Official Monograph - Endotoxin Indicator for Depyrogenation.

validation of the Limulus Amebocyte Lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological product, and medical devices.

Van D.,Van D. V. H. Factors affecting pyrogen testing in rabbits, developments in biological standardisation.1977;34:57-63.

Weary, M and F Pearson.A manufacturer's guide to depyrogenation.Biopharm.1, 1988.

WESTEPHAL O, LUEDERITZ O, STAUB AM- Bacterial endotoxins. JMed Pharm cherm, 1961 ; 4 ; 497-504.

WESTPHAL O. et al. *Bacterial endotoxins.Inst. Arch. Allergy, 1975,* ***40****, p : 1-43.*

Williams Kevin, 2003, Endotoxins pyrogens, « LAL testing ,anddepyrogrnation »,second edition Drugs and pharmaceutical sciences ,James Swarbrick Ed, volume 111,P.29-36.

Young, N.S., et al. (1972) An invertebrate coagulation system activated by endotoxin : evidence for enzymatic meditation . j.clin. invest. 51 :1790-1797.

ANNEXES

Annexe non biologique utilisées dans ce travail

1) Accessoire du Kit LAL.

	**Flacon LAL**
	**Flacon control standard endotoxine (CSE)**
	**Eau réactif LAL**
	**Tubes de réactionsdépyrogénés**

2) Appareillage et verreries

Appareillage	Verreries	Autre
► **Etuve.** ► **Réfrigérateur.** ► **Agitateur (Vortex).** ► **Balance électrique. (Kg et g)** ► **pH-mètre.** ► **Incubateur.** ►**Enregistreur de température**.	►**Becher stériles et apyrogènes** ► **Flacons stériles et apyrogènes** ►**Tubes a essais stériles et apyrogènes**	►**Papier aluminium** ► **Gants jetables** ► **Marqueurs** ►**Portoir pour tube** **Seringues graduées stériles et apyrogènes** ►**Huile de vaseline** ►**Alcool** ►**Coton**

3) Reconstitution du Control Standard Endotoxin

Accompli de dilution correcte requise à la sensibilité du lysat en divisant la concentration en endotoxine sur ʎ d'étalon (CSE)

20EU/0.125= 160 ⇨ 20EU est équivalente à 160ʎ

(1/10)

1mL (CSE) + 9mL (eau EEB) ⇨ 16ʎ

4mL (CSE) + 4mL (eau EEB) ⇨ 08ʎ

4mL (CSE) + 4mL (eau EEB) ⇨ 04ʎ

4mL (CSE) + 4mL (eau EEB) ⇨ 02ʎ

1mL (CSE) + 1mL (eau EEB) ⇨ 01ʎ

1mL (CSE) + 1ml (eau EEB) ⇨ 1/2ʎ

1ml (CSE) + 1mL (eau EEB) ⇨ 1/4ʎ

4) l'enregistrement de température durant les 180 minutes.

	NaCl matière première (Lot N°1)			NaCl produit fini (Lot N°1)		
	1	2	3	7	8	9
Température initiale	39.4 39.4 39.4 * 39.4	39.2 39.2 39.2 *39.2	39.3 39.3 39.3 *39.3	38.9 38.9 38.9 *38.9	38.6 38.6 38.6 *38.6	39.4 39.4 39.4 *39.4
15 min	39.4	39.3	39.4	38.7	38.8	39.5
30 min	39.4	39.4	39.5	38.8	38.9	39.6
45 min	39.4	39.4	39.5	38.8	38.9	39.6
60 min	39.4	39.5	39.3	38.7	38.6	39.4
75 min	39.4	39.5	39.4	38.6	39.5	39.4
90 min	39.4	39.5	39.5	38.5	39.5	39.5
105 min	39.3	39.6	39.6	38.9	39.5	39.4
120 min	39.3	39.6	39.4	38.9	39.4	39.4
135 min	39.3	39.6	39.3	39.0	39.4	39.4
150 min	39.4	39.8	39.3	39.0	39.5	39.5
165 min	39.4	39.8	39.3	39.0	39.5	39.5
180 min	39.4	39.8	39.3	39.0	39.5	39.5

5) Certificat d'analyse du LAL.

Endosafe®
LAL Grade Glassware (T400)
Certificate of Quality

Charles River Laboratories 10 x 75 mm Borosilicate Glass Test Tubes without Caps, 50/Pack
Lot Number 93621D has been depyrogenated in a dry heat oven using a validated process.
The lot has been tested by Quality Control and meets the following test specifications:

Endotoxin Test Result: < 0.005 EU/device
Interference Test Result: Pass
Expiration Date: Dec 2019

Checked By: Date: 04 Jan 2017
Reviewed By: Date: 05 Jan 2017

Charles River Laboratories
1023 Wappoo Road
Charleston, SC 29407

CQ-T400-05

The user of this document is responsible to confirm that this Certificate matches the product of interest.

charles river

CERTIFICATE OF ANALYSIS

VIAL CONTENTS: Endosafe® Control Standard Endotoxin is prepared from *E. coli* strain 055:B5. Each vial contains 10 ng of purified Lipopolysaccharide, freeze dried in a stabilized matrix.

RSE/CSE RATIO: The potency of this standard in Endotoxin units, (EU) has been determined to be 15 EU/ng by the method formerly described in Appendix C (***Gel-clot Technique***) of the GUIDELINE ON VALIDATION OF THE LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE TEST AS AN END PRODUCT ENDOTOXIN TEST FOR HUMAN AND ANIMAL PARENTERAL DRUGS, BIOLOGICAL PRODUCTS, AND MEDICAL DEVICES, published by the U.S. Food and Drug Administration.

CSE Lot: EX54652 CSE Exp. Date: Mar 2018
LAL Reagent Lot: G4861L LAL Exp. Date: Feb 2019
RSE Lot: H0K354 RSE/CSE Ratio: 15 EU/ng Vial contents: 150 EU/vial
Geometric Mean Sensitivity with RSE: 0.125 EU/mL

IS/CSE RATIO: The Expert Committee on Biological Standardization of WHO has assigned a potency of the IS as 10,000 IU per vial of IS, so that 1 IU = 1 EU. The potency of this endotoxin standard in International (Endotoxin) Units, IU, has been designated as 15 IU/ng.

DIRECTIONS FOR USE: Reconstitute the lyophilized material with 7.5 mL of LAL reagent grade water to obtain 20 EU/mL or 20 IU/mL. Vortex mix vigorously for at least 5 minutes after rehydration, and for at least 1 minute immediately prior to each use.

STORAGE: Store rehydrated material at 2-8°C for up to 4 weeks. Store lyophilized material at controlled room temperature or refrigerated as preferred. Diluted endotoxin should not be stored except under validated conditions.

CAUTION: DO NOT FREEZE ENDOTOXIN SOLUTIONS

Prepared By: Date: 19 Oct 2015
Quality Reviewed By: Date: 19 Oct 2015

CA-GC10-05

1023 Wappoo RD Suite 43-B, Charleston, SC 29407 • 843-402-4900 • Fax: 843-766-7576 • www.criver.com

Endosafe®
Endotoxin Indicators (EVV10K)
Certificate of Quality

Each vial of Endotoxin Indicator Lot #: EVV6166 Expiration Date: Jun 2018
contains approximately 1,000 ng of lipopolysaccharide (derived from *E.coli* Strain 055:B5).
The biological activity is approximately 10,000 Endotoxin Units (EU) of lipopolysaccharide, as determined by serial two-fold dilution at the endpoint with Gel Clot U.S. Reference Lysate Lot #: 15.
The absence of assay interfering substances was demonstrated by acceptable spike recovery in the range of 50% to 200%

Qualified Analyst: Date: 29 Jun 2016
Reviewed By: Date: 13 Jul 2016

Charles River Laboratories, Inc.
1023 Wappoo Road, Suite 43-B
Charleston, SC 29407

CQ-EVV10T-04

Endosafe®
LAL Reagent Water (LRW)
Certificate of Quality

Charles River Laboratories, Inc. LAL Reagent Water Lot Number 20016002 has been tested by Quality Control and meets the following test specifications:

Endotoxin Test Result: < 0.001 EU/mL
Interference Test Result: Pass
Expiration Date: Jul 2019

Qualified Analyst: Date: 01 Dec 2016
Reviewed By: Date: 02 Dec 2016

Charles River Laboratories, Inc.
1023 Wappoo Road, Suite 43-B
Charleston, SC 29407 USA

CQ-LRW-05

Liste des figures

N°	Titres	Pages
01	Structure fondamentale de la membrane cellulaire des bactéries à Gram négatif.	**8**
02	Structure fondamentale et composition chimique d'endotoxine bactérienne.	**10**
03	Induction par endotoxine bactérienne en stimulant les macrophages et les médiateurs cellulaires contre l'infection.	**13**
04	Schéma réactionnel du test par technique de gélification.	**16**
05	Crabes en fer à cheval d'espèce de *Limulus. Polyphemus*	**20**
06	Extraction du sang bleu des limules.	**20**
07	Turbidité densité de la solution traitée par endotoxine de la bactérie de *E. coli* au bout de quelques minutes	**20**
08	Observation microscopique d'Amoebocytes en réaction avec les endotoxines	**20**
09	Schéma représentatif des différents facteurs activés par les endotoxines	**22**
10	Principe de réaction des endotoxines bactériennes in vivo (RPT) et in vitro (LAL)	**39**
11	Variation de température entre la température initiale et la la température maximale du lot (1).	**42**
12	Variation de température entre la température initiale et la la température maximale du lot (3).	**42**
13	Recouvrement de la RSE valide	**45**

Liste de tableaux

N°	Titres	Pages
I	Caractéristique et condition d'hébergement des animaux de l'expérimentation.	**29**
II	Tableau représente la répartition des lots des lapins dans l'expérience.	**32**
III	Tableau représentatif de la mesure de température corporelle des lapins à essai pondent 90 minutes (Control préliminaire).	**32**
IV	Tableau représentatif de la mesure de température corporelle des lapins à essai pondent 3 heures (Essai principale).	**32**
V	Calcul de la DMS pour le M.P et P.F du NaCl	**34**
VI	Résumé de la méthode de confirmation de la sensibilité du lysat.	**35**
VII	Résumé des préparations des solutions pour la recherche des facteurs d'interférence	**37**
VIII	Préparation des solutions pour l'essai limite.	**38**
IX	sélection des lapins selon leur température initiale.	**40**
X	Résultats de température après injection de produit à examiner NaCl.	**41**
XI	Résultat de l'essai au point final	**43**
XII	Calcul de la sensibilité expérimentale.	**43**
XIII	Résultat de recherche de l'interférence.	**46**
XIV	Calcul des sensibilités expérimentales	**47**
XV	les facteurs agissants et interférents investissant dans la réaction LAL.	**51**
XVI	Résultat de l'essai limite obtenus pour le NaCl (M.P)	**52**
XVII	Résultat de l'essai limite obtenus pour le NaCl (P.F)	**52**