

INTRODUCTION



Les endotoxines sont des substances de nature liposaccharidique contenues dans la paroi des bactéries à Gram négatif. Elles ne diffusent pas dans les milieux de culture mais sont libérées lors de la lyse des corps bactériens.

Elles sont les principales responsables des effets toxiques attribués à la contamination des médicaments par des **pyrogènes**.

Leur activité pyrogène est plus élevée que celle de la plupart des autres substances pyrogènes.

Les principales réactions suite à l'injection d'endotoxines sont une hyperthermie et des réactions vasculaires de type hypotension et coagulation intra vasculaire disséminée (CIVD).

Il n'existe aucun traitement spécifique, on a uniquement des traitements symptomatiques ; d'où la nécessité de les détecter dans les préparations injectables (solutés, vaccins, perfusions).

L'essai des endotoxines bactériennes est destiné à la détection ou la quantification des endotoxines produites par les bactéries Gram-négatives.

L'objectif de notre travail est la validation du contrôle des endotoxines bactériennes par la méthode au *Limulus* amebocyte lysate (test LAL) pour le VACCIN AMARIL STABILISE.

Pour ce faire, dans une première partie nous allons définir la fièvre jaune et son vaccin, les endotoxines et les différentes méthodes de détections.

Dans une deuxième partie, nous allons exposer notre travail personnel qui consiste en un test de conformité un essai de recherche des interférences et un essai de routine.

PREMIERE PARTIE : GENERALITES



I. NOTIONS GENERALES SUR LA FIEVRE JAUNE

I.1. AGENT PATHOGENE ET VECTEUR

La fièvre jaune est une fièvre hémorragique virale qui affecte chaque année approximativement 200 000 personnes de part le monde et entraîne environ 30 000 décès. L'agent pathogène est le virus amaril de la famille des Flaviviridae. Le principal vecteur de la fièvre jaune dans les villages et en agglomération est la femelle *Aedes aegypti* puisque seules les femelles se nourrissent de sang. La transmission du virus s'effectue lorsqu'un moustique, après avoir piqué un être humain infecté et après une période d'incubation extrinsèque (à l'intérieur du moustique), pique un individu réceptif. *A. aegypti* se reproduit très facilement dans tous les types de gîtes artificiels domestiques et péri-domestiques conservant l'eau fraîche tels que les vases, les réservoirs d'eau, les boîtes de conserve, les noix de coco cassées, les pneus usagés et les égouts [40].

I.2. SIGNES CLINIQUES

La maladie se caractérise par l'apparition soudaine :

- de fièvre,
- de maux de tête,
- de mal de dos,
- de douleur musculaire généralisée,
- de nausées et de vomissements.
- Certains cas plus modérés de fièvre jaune peuvent ne pas présenter d'ictère.

Une bradycardie caractéristique est liée à la température (signe de Faget).

Environ 15 % des personnes infectées développent une forme sévère de la maladie comprenant plusieurs phases :

- une phase aiguë d'environ 3 jours avec apparition soudaine de fièvre, de maux de tête, de myalgies, de nausées et de vomissements

- suivie d'une période de rémission pouvant aller jusqu'à 24 heures (fièvre caractéristique en forme de "U")
- d'une phase toxique avec ictère et vomissements (vomito negro) au cours de laquelle peuvent survenir des signes hémorragiques (saignements des gencives, du nez et hématurie), albuminurie et oligurie (diminution de la production d'urine). Le patient peut souffrir de hoquet, de diarrhée, de tachycardie progressive et de choc. L'examen de l'abdomen révèle des douleurs épigastriques intenses. Plus de la moitié des individus qui atteignent la phase toxique ne survivent pas. La mort survient généralement entre le septième et le dixième jour suivant l'apparition de la maladie.

I.3. LE VACCIN AMARIL STABILISE

Le vaccin amaril, l'un des premiers vaccins antiviraux développés, a démontré son efficacité et sa bonne tolérance. La protection conférée par le vaccin amaril est d'au moins 10 ans et dure peut-être toute la vie [40]. 95 % des personnes vaccinées sont immunisées après administration d'une seule dose.

Au Sénégal, la seule unité de production du vaccin est à l'Institut Pasteur de Dakar. C'est l'unique vaccin produit par l'IPD [21].

Le VACCIN AMARIL STABILISE est un vaccin vivant lyophilisé thermostabilisé, préparé à partir de la souche atténuée Rockfeller 17 D sur embryons de poulet exempt de germes pathogènes spécifié en particulier du virus de la leucose aviaire (normes WHO TRS-872, 1998).

Les vaccins ont ceci de particulier qu'ils sont généralement administrés à de très grands nombres de personnes en bonne santé; c'est pourquoi l'innocuité et la qualité de ceux-ci sont essentielles. Un certain nombre de risques potentiels et théoriques s'attachent à leur utilisation, à savoir la présence accidentelle d'agents dérivés des matériaux sources ou introduits pendant la fabrication ou,

dans le cas des vaccins vivants, la présence de micro-organismes virulents (retour à la virulence du virus vaccin). Dans ces cas-là, il peut y avoir risque éventuel pour l'ensemble de la communauté, et non pas uniquement pour les personnes vaccinées.

En raison de ces risques potentiels pour la santé publique et de la complexité et de la variabilité des produits, l'OMS recommande que les tests de qualité des fabricants (test de stérilité, thermostabilité, innocuité, humidité résiduelle, endotoxines) soient passés en revue et que les autorités nationales de réglementation procèdent éventuellement à des épreuves complémentaires avant d'autoriser la mise en circulation d'un produit. Un niveau élevé d'expertise scientifique spécialisée est donc exigé pour la réglementation et les essais avant mise en circulation des lots de vaccins [40, 66].

Le contrôle qualité du vaccin s'opère à tous les stades de la fabrication. La recherche des endotoxines s'effectue sur le produit fini [21].

II. DEFINITION DES ENDOTOXINES BACTERIENNES ET LOCALISATION

II.1. DEFINITION

Les endotoxines sont des complexes macromoléculaires toxiques présents de manière constitutive dans la membrane externe de toute bactérie à Gram négatif. [17] Les termes "endotoxine" et "lipopolysaccharide" sont souvent indifféremment utilisés dans la littérature scientifique [14].

Cependant le terme "lipopolysaccharide" devrait être réservé pour désigner des substances chimiques pures, libres de tout autre composé chimique présent dans la membrane des bactéries à Gram négatif. C'est une substance thermostable biologiquement active.

Le terme « endotoxine » désignait à l'époque de sa découverte par **PFEIFER** en 1892, une toxine en majorité polysaccharidique, thermostable et retrouvée dans le filtrat de culture sous forme encore liée à la cellule au niveau des protéines de la membrane externe. Ce terme avait donc été choisi par opposition au premier type de toxine connue "l'**exotoxine**" de nature protéique, thermolabile et retrouvé libre, détaché de la cellule dans le filtrat de culture [51]. Le terme « endotoxine » devrait être réservé aux fragments de membrane des bactéries à Gram négatif qui contiennent le lipopolysaccharide et les autres composés de la membrane cellulaire. L'endotoxine est la forme trouvée usuellement dans la nature, bien que des lipopolysaccharides puissent se trouver dans l'eau ou se développent les bactéries à Gram négatif [17].

La détection d'endotoxines témoigne de la présence antérieure de bactéries. Ils sont responsables de chocs févriques si elles sont injectées directement dans le sang.

II.2. LOCALISATION DES ENDOTOXINES

Les lipopolysaccharides (LPS) constituent la couche la plus externe de la membrane externe des bactéries à Gram négatif [46]. La paroi des bactéries à Gram négatif est constituée de trois couches :

- Une membrane **interne** ou **cytoplasmique** qui sert de barrière osmotique ;

- Une membrane **intermédiaire**, à base de peptidoglycanes, qui maintient l'intégrité de la structure et la forme caractéristique de la bactérie ;
- Une membrane **externe** contenant les lipopolysaccharides, identifiés dans toutes les bactéries Gram négatif étudiées, responsable d'une partie de l'activité biologique [17].

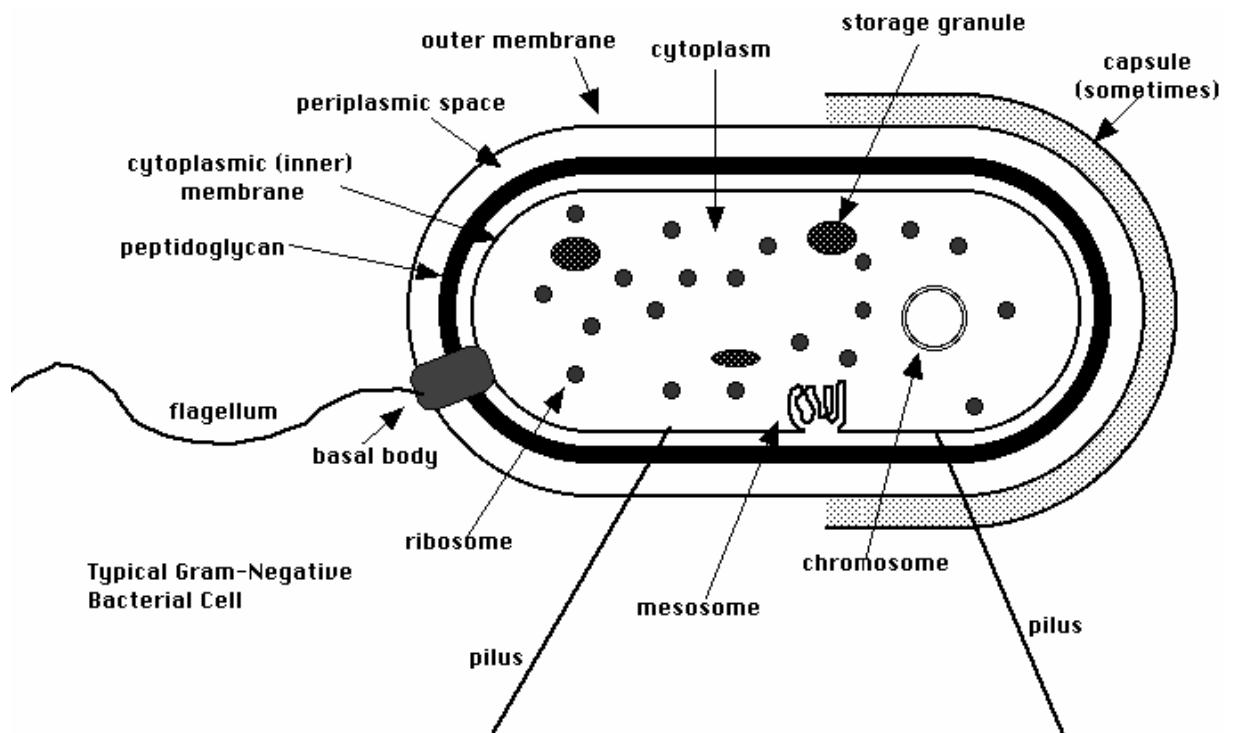


Figure 1 : Bactérie à Gram négatif [10]

III. STRUCTURE DES ENDOTOXINES

Les endotoxines sont donc constituées d'un fragment de paroi de bactérie Gram négatif et du lipopolysaccharide (LPS). Le LPS n'est pas une molécule unique mais une famille de composés ; chaque genre et chaque espèce de bactéries produit un LPS spécifique : les bactéries d'une même famille produisent des LPS de structures similaires, alors que les bactéries de familles différentes produisent des LPS différents [16, 17].

Les LPS, parties biologiquement actives des endotoxines, sont eux-mêmes constitués de deux parties :

- Une partie **polysaccharidique**, fabriquée à partir d'un noyau oligosaccharidique , le « core » ou base, et d'une chaîne O spécifique ;
- Une partie **phospholipidique**, le lipide A, siège de l'activité pro-inflammatoire.

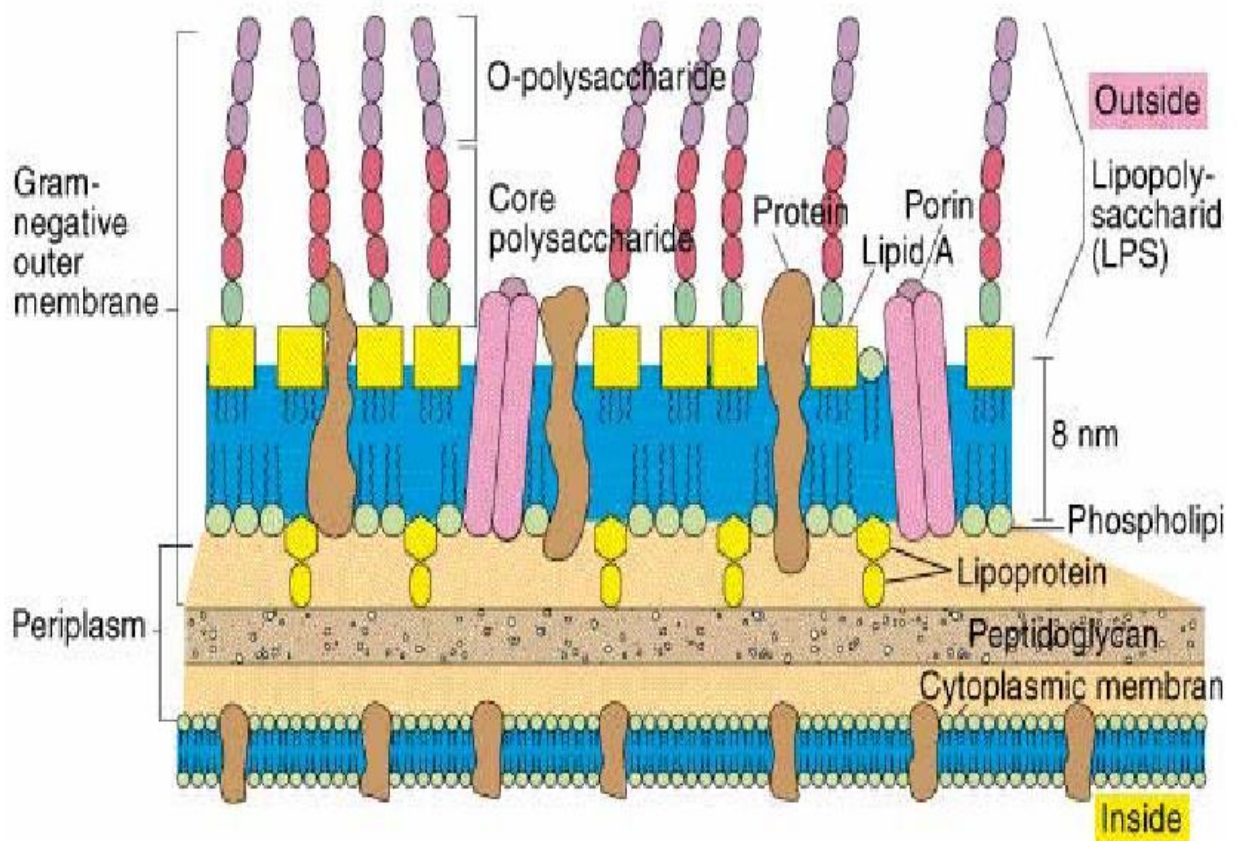


Figure 2 : Paroi de bactéries à Gram négatif [10]

III.1. LA FRACTION POLYSACCHARIDIQUE

III.1.1. La chaîne O spécifique

Elle s'insère sur le « core » polysaccharidique ou base : cette chaîne O spécifique peut avoir une grande diversité de structure [16, 17].

Elle est constituée « d'unités d'oligosaccharides » (chaînon) qui se répètent, chacune contenant cinq à sept monosaccharides. Le nombre total d'unités d'oligosaccharides varie, selon l'espèce bactérienne, de vingt à quarante [14]. Des monosaccharides différents constituent les unités d'oligosaccharides des espèces différentes de bactéries à Gram négatif. On a des hexoses classiques (glucose, galactose, mannose) ou des sucres particuliers (tyvelose, paratose). De plus la nature, la séquence, le type de liaison et le groupe de fonction de substitution des monosaccharides varient avec chaque genre et chaque espèce de bactéries.

III.1.2. Le noyau d'oligosaccharide

Le noyau d'oligosaccharide est divisé en deux portions [65] :

- Le noyau (ou core) interne, attaché au lipide A, en position 6 du N-acetylglucosamine. Le noyau interne contient deux sucres inhabituels : l'heptose et l'acide 3-desoxy-D-manno-2-octulosonique (KDO)

Le KDO est une molécule spécifique des lipopolysaccharides. Un résidu de KDO est lié covalentiellement au lipide A et selon les espèces le nombre de résidu de KDO est variable (généralement deux ou trois). L'heptose qui peut être présent sous différentes configurations peut éventuellement faire défaut chez quelques espèces.

- Le noyau (ou core) externe qui est attaché à la chaîne poly-saccharide O spécifique est fait de monosaccharides tels que : D-glucose, D-galactose...

On ne connaît pas d'autres rôles au noyau externe que de fournir un site de fixation à la chaîne O spécifique.

III.2. LE LIPIDE A

Il est constitué d'un dimère de N-acetyl-glucosamine phosphorylé comprenant six ou sept acides gras (le plus souvent six).

Tous les acides gras du lipide A sont saturés, certains sont liés directement au dimère; d'autres le sont par l'intermédiaire d'une fonction ester.

C'est par le lipide A que se fixe le LPS à la couche externe de la membrane cellulaire. Il constitue l'ultime spécificité des LPS car les molécules de lipide A sont différentes selon les espèces et à l'intérieur d'une même famille de bactéries.

La synthèse du lipide A est la première étape de l'élaboration du LPS. Les gènes impliqués sont dispersés, et dans certains cas, associés à des gènes responsables dans la synthèse d'autres macromolécules [1].

Le lipide A isolé n'existe pas dans la nature, en tant que précurseur du LPS : au niveau de la membrane cytoplasmique, il se forme un composé précurseur du lipide A, auquel se fixe le KDO, puis les sucres composant le core viennent s'ajouter de façon séquentielle pour former l'unité « lipide A – core oligosaccharide » [51].

La chaîne principale du lipide A des Enterobacteriaceae est le disaccharide β -glycosaminyl-(1-6)- α glucosamine (GlcNII). Ce disaccharide phosphorylé en 1

et 4' n'a été identifié que dans le lipide A. Le noyau interne se fixe au groupement hydroxyle du GlcNII en 6'.

NB : Les LPS issus des bactéries peuvent contenir des impuretés et en particulier des cations Na^+ , K^+ , Ca^+ , mais aussi des amines telles que ethanolamine, putrescine, spermine. Le rôle de ces substances n'est pas connu [17].

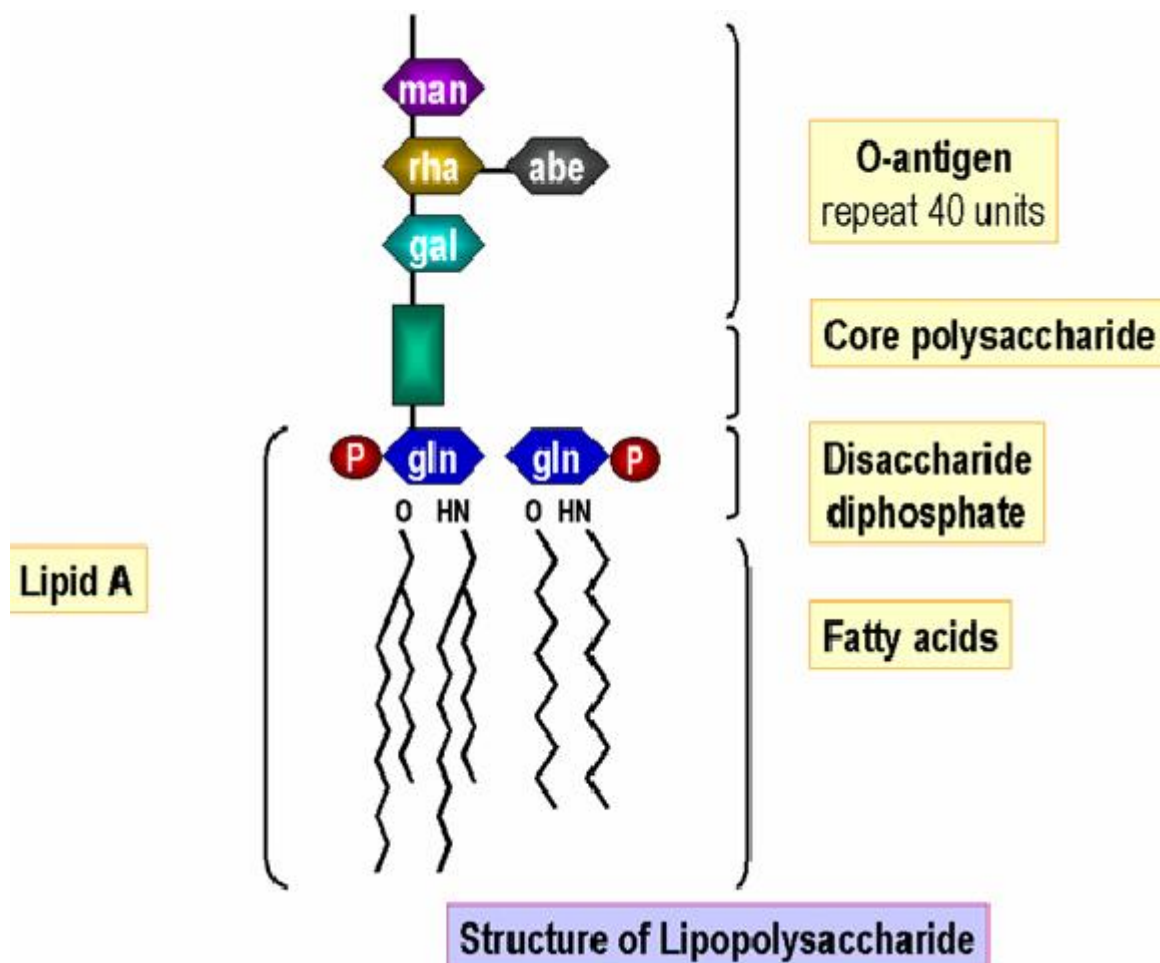


Figure 3 : Structure chimique du LPS [10]

IV. PROPRIETES BIOLOGIQUES

Le LPS est un complexe macromoléculaire comportant une portion lipidique liée de façon covalente à une partie polysaccharidique est responsable de la majorité des effets biologiques liés à l'infection par les germes à Gram négatif.

La composante glucolipidique constante du LPS, le lipide A, est le support des propriétés endotoxiques thermostables.

La spécificité sérologique réside dans la portion polysaccharidique variable qui correspond à l'antigène somatique O des bactéries à Gram négatif [51].

IV.1. POUVOIR PATHOGENE [14]

La libération d'endotoxine dans la circulation sanguine, notamment à la suite d'une septicémie à bactéries à Gram négatif, peut conduire à un choc endotoxique et à la mort. A titre d'exemple, on estime que le nombre des septicémies dues à des bactéries à gram négatif atteint chaque année 300000 individus aux Etats Unis d'Amérique et le taux de mortalité peut atteindre 50%.

Les traitements antibiotiques peuvent conduire à une libération importante d'endotoxine. L'importance de cette libération est variable selon les molécules et, d'une manière générale, les antibiotiques peuvent être classés (en allant des molécules faisant libérer les quantités les plus importantes vers les molécules faisant libérer les quantités les plus faibles) de la manière suivante : céphalosporine, pénicillines, imipenem, aminosides et quinolones.

L'injection d'endotoxine à l'animal provoque des effets tels que : la fièvre, l'hypotension, des troubles de la coagulation, une neutropénie et un avortement chez les femelles en gestation.

IV.1.1. L'effet léthal

L'intensité du pouvoir pathogène des endotoxines est variable selon espèce animale et selon la bactérie mais les signes observés sont pratiquement toujours identiques. Une forte dose d'endotoxine (environ 0,025 mg /Kg chez le chien et le lapin ou 2,5 mg /Kg chez le rat et la souris) provoque un effet léthal [28].

IV.1.2. L'effet pyrogène [36]

L'endotoxine agit comme un pyrogène c'est à dire qu'elle donne la fièvre, lorsque les bactéries Gram négatif s'accumulent dans les tissus en quantité suffisante pour venir en contact avec la circulation. La fièvre est provoquée par des quantités très faibles d'endotoxine. Environ 100 ng (0,1 µg) injectés par voie intraveineuse chez un adulte volontaire entraînent une réponse pyrogène mesurable c'est à dire de la fièvre. Il faut noter que cette réponse est produite par dix millions de bactéries intestinales, ce qui n'est pas une masse bactérienne particulièrement importante. La flore intestinale normale contient un nombre de bactéries à peu près un million de fois supérieur à cela. Si toute l'endotoxine contenue dans l'intestin devait pénétrer dans le sang et si la fièvre suivait une courbe linéaire, on aurait une température d'environ un million de degrés !

De toute évidence, la quantité d'endotoxine qui passe de l'intestin dans la circulation portale est probablement très faible. Néanmoins, cette quantité d'endotoxine est suffisante pour maintenir un niveau de base de stimulation de la réponse immune, qui est constant, chez les personnes en bonne santé, sans que cela n'entraîne de manifestation pathologique.

La fièvre est produite par l'endotoxine qui induit la libération d'une protéine à partir des phagocytes mononuclées ; cette protéine est connue sous le nom de pyrogène endotoxine. Les plus connues de ces protéines sont IL1 et TNF qui déclenchent toute une série complexe d'évènements que l'on appelle réponse en

phase aiguë. Cette fièvre s'accompagne d'une modification du taux des protéines plasmatiques dites de la phase aiguë de la réaction inflammatoire, à savoir le fibrinogène, la protéine C-réactive, la transferrine etc.

IV.1.3. La réaction générale de Schwartzman (nécrose tissulaire)

Les effets des endotoxines sur la coagulation sont bien illustrés par les réactions de Schwartzman (hypersensibilité non spécifique) observées après deux injections d'endotoxine effectuées à 12 ou 18 heures d'intervalle. Une réaction locale est obtenue par une injection intradermique suivie d'une injection intraveineuse et elle se traduit par une nécrose hémorragique de la zone intradermique. Une réaction générale est obtenue par deux administrations intraveineuses et provoque une nécrose bilatérale du cortex rénal. Les réactions de Schwartzman s'expliquent par une occlusion des petits vaisseaux par de la fibrine et par une coagulation intravasculaire disséminée [47, 49].

IV.1.4. La neutropénie

Cette neutropénie s'accompagne le plus souvent d'une diminution du nombre des plaquettes et d'une leucocytose [34].

IV.1.5. L'hypotension [36, 49]

L'hypotension est observée environ 30 minutes après une administration d'endotoxine. Elle s'accompagne d'une diminution de la circulation veineuse et d'une congestion des organes. L'hypotension est due à une série de réactions complexes provoquée par l'endotoxine. On a suggéré récemment que les

médicaments clefs de l'hypotension induite par l'endotoxine sont le tumor necrosis factor (TNF) et l'interleukine-1(IL-1). L'importance de l'hypotension est donc considérablement réduite par l'administration de sérum anti-tumor necrosis factor ou de sérum anti-interleukine-1 avant injection d'endotoxine. Une hypothèse plus ancienne suggère que la baisse de la résistance des vaisseaux périphériques est due à l'accumulation d'amines vasoactives (histamines et kinines). Des travaux importants sont en cours pour essayer de comprendre les bases moléculaires du choc endotoxinique.

IV.1.6. La coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)

C'est le nom donné au dépôt de micro caillots dans les petits vaisseaux, entraîne des lésions graves au niveau des organes privés d'apport sanguin. Les effets sont particulièrement sévères au niveau des reins, où l'on observe une nécrose corticale. Les autres organes également affectés sont le cerveau, les poumons et les glandes surrénales [49].

L'endotoxine contribue à la coagulation sanguine de trois manières :

- Elle active le facteur XII (facteur de Hageman) qui déclenche la cascade de la coagulation.
- Elle entraîne une libération du contenu des granules plaquettaires.
- Elle induit la libération, à partir des polynucléaires neutrophiles, de protéine de base qui stabilisent les caillots de fibrine.

IV.1.7. L'action abortive

Cette action se produit avec des doses non létales pour la femelle, résulte d'hémorragies placentaires [49].

IV.2. PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES

IV.2.1 La spécificité sérologique [46]

Cette spécificité réside dans la portion polysaccharidique variable du LPS qui correspond à l'antigène somatique O des souches lisses ou à la partie externe du core oligosaccharide des souches R.

L'injection de bactéries à Gram négatif ou de LPS à un animal induit la production d'anticorps dirigés contre les déterminants polysaccharidiques.

L'antigène O est hautement immunogène. Cependant, l'immunogénicité diminue considérablement ou s'annule quand il est séparé du lipide A. L'antigène O se comporte donc comme un haptène dont l'activité immunologique nécessite l'effet adjuvant du lipide A ou d'une protéine, quand il s'agit de l'antigène O préparé par hydrolyse acide du LPS.

L'antigène O est un antigène thymoindépendant, c'est à dire qu'il donne une réponse anticorps en l'absence de cellules T.

Les complexes antigènes –anticorps formes activent ensuite le système complément en se fixant à son composant C1q (voie classique) aboutissant à la lyse, cellulaire ou à la phagocytose.

Les anticorps produits sous l'effet du LPS sont essentiellement de nature IgM. Il peut également s'agir d'IgA, c'est le cas lors d'immunisation par *Salmonella enterica* (serovar typhi) ou d'IgG. Des raisons de la stimulation préférentielle d'IgM restent encore inexplicées.

Tous les anticorps sont protecteurs mais la protection conférée par IgM est mille fois plus effective, cet anticorps étant plus apte à provoquer la lyse. Ceci a pu être démontré par l'utilisation d'anticorps monoclonaux.

Théoriquement, les anticorps dirigés contre des portions actives du LPS donnent lieu à des réactions croisées anti-LPS et protectrices, lors d'infections systémiques à bactéries Gram négatif diverses.

Ce phénomène est accentué chez les souches R, chez lesquelles la spécificité antigénique est pratiquement nulle [34].

Il existe une tolérance immunogénique aux LPS :

- Une tolérance **précoce** induite par l'exposition à des doses sublétales de LPS ; l'injection est suivie d'une réponse qui décroît en 3 à 4 jours et se normalise. Cette tolérance est attribuée à des modifications hématopoïétiques spécifiques et à une diminution de la capacité à produire des cytokines.
- Une tolérance **tardive**, durable, qui est le résultat de la production d'anticorps anti-LPS.

Contrairement à la tolérance précoce, la tolérance tardive est seulement spécifique du LPS inducteur.

IV.2.2. Mécanisme d'action In vivo des LPS

Quand le LPS est libéré de la surface bactérienne, il se complexifie avec des protéines liant le LPS (LBP) telle que la CD 14, avant de se lier à des récepteurs spécifiques des LPS sur les cellules hôtes (monocytes, macrophages ou neutrophiles). Il s'en suit une activation cellulaire [51].

Les macrophages activés libèrent des cytokines : l'interleukine-1(IL1) et le (tumor necrosis factor) TNF.

Ces deux types de cytokines agissent sur presque toutes les cellules, et augmentent l'expression des gènes impliqués dans le processus inflammatoire.

L'endotoxine stimule également l'immunité humorale. La grande variété des anticorps anti-LPS produits, témoigne de la diversité de structure de l'endotoxine et des particularités des différentes bactéries à Gram négatif.

IV.2.3. Propriétés immunologiques non spécifiques du LPS

➤ L'effet adjuvant :

L'effet adjuvant est connu depuis longtemps, et on savait que l'adjonction de vaccin TAB (thyphoïde et parathyphoïde A et B) à une autre vaccination augmentait de façon importante la réponse immunitaire vis-à-vis de la vaccination concomitante. Cette action adjuvante est le fait du lipide A et elle peut être obtenue lorsque l'endotoxine est administrée moins de six heures après l'injection de l'antigène [24].

D'autre part, l'endotoxine rompt la tolérance immunologique à un antigène.

➤ La stimulation des lymphocytes B

En induisant la libération d'IL1, l'endotoxine induit la prolifération des lymphocytes B (mais pas celle des lymphocytes T). Les lymphocytes B matures se transforment en cellules productrices d'anticorps. L'élévation du taux des anticorps qui en résulte contribue à augmenter la résistance à l'infection [51].

L'endotoxine stimule la prolifération de lymphocytes B de souris en provoquant l'augmentation de la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (DNA)

➤ Activation du complément [49]

Chez les malades souffrant d'une infection à bactérie à Gram négatif comme chez les animaux ayant reçu de l'endotoxine, on observe une baisse du taux de complément qui intervient simultanément avec la thrombocytopenie et la

leucopénie. Le système complément joue certainement un rôle dans l'augmentation de la coagulation sanguine due à l'endotoxine. Le LPS peut activer le complément par la voie alterne: le composant C3 en association avec des protéines sériques, complexe le lipide A, aboutissant à la lyse.

La bactérie est protégée de cette action non spécifique du complément par l'antigène O. C'est pourquoi, les mutants rugueux y sont plus sensibles.

V. LPS ET VIRULENCE BACTERIENNE

La perte de virulence liée à la mutation « smooth, rough » (S, R) suggère un rôle possible des chaînes latérales dans la pathogénécité d'une souche. De ce fait, dans certains cas, les différences observées entre souches virulentes et souches avirulentes peuvent être interprétées d'après la composition du LPS. Cependant, les grandes variations de virulence entre des souches smooth d'un même genre, ou d'un même sérotype, font penser qu'elles ne dépendent pas seulement de la composition du LPS. Les différences peuvent être aussi quantitatives. La surface de la bactérie joue un rôle dans la protection de la cellule contre son environnement, et permet aux bactéries de s'adapter à certaines conditions. Elle rend même certaines souches résistantes à l'action bactéricide des lysosomes des polynucléaires [28].

La structure du LPS, qui s'étend à l'extérieure de la paroi, retient le complexe anticorps-complément éloigné de la membrane. De plus, dans les premières étapes de l'infection, l'endotoxine libérée sans dommage pour la bactérie pourrait diminuer localement les défenses de l'hôte [9].

Les chaînes latérales à spécificité O constituent la région du LPS la plus impliquée dans la virulence.

C'est pourquoi les souches rugueuses sont généralement moins virulentes que les souches lisses.

L'antigène O intervient d'abord dans la première phase de l'infection : il constitue un moyen d'**attachement** à des récepteurs cellulaires [57].

Chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*, les sérotypes ayant un LPS de type lisse **adhèrent** plus massivement aux anneaux trachéens que les LPS de type intermédiaire [2].

Dans une étape plus tardive, l'antigène O permet à la bactérie d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. En effet, le complément peut être activé par la voie alterne, par fixation de son composant C₃ sur le lipide A. Pour la plupart des germes, cette lyse n'est possible que pour les mutants rugueux : les chaînes latérales à spécificité O bloquent l'accès du complément à la bactérie.

L'antigène O protège donc la bactérie de la lyse [33].

Une souche rugueuse de *Salmonella enterica s. v Choleraesuis* n'était virulente qu'après inoculation dans une veine ou dans le péritoine, et non après administration orale : l'antigène O est nécessaire à la survie du germe dans le tractus digestif [20].

En outre, chez les souches lisses (S), l'accès du complément à la bactérie diminue avec l'épaisseur de l'antigène O.

V.1. NOTION DE BIOFILM [3]

Les techniques d'observation, comme la microscopie confocale à balayage laser qui permet d'obtenir des images en trois dimensions, ont permis de découvrir des amas de cellules fixées à un support, regroupées à l'intérieur d'une matrice polysaccharidique sécrétée par elles mêmes, se comportant telles des colonies organisées ayant pour but de s'auto protéger et de « socialiser » leurs comportements. L'association des microorganismes au sein d'une matrice d'exopolymères attachée à une surface est appelée un **biofilm**.

Un biofilm ressemble à une communauté complexe, hautement différenciée, regroupée en différentes niches qui sont fonction de la particularité de la population microbienne en présence. La découverte d'un tel type d'organisation

à mis en évidence une faiblesse des antibiotiques et des détergents, des matériaux industriels, mais aussi une sous estimation importante vis à vis de la biomasse que les bactéries attachées représentent et de leurs rôles dans les cycles biogéochimiques, ainsi que des relations qu'elles peuvent avoir avec d'autres organismes vivants, que ce soit dans le milieu aérien ou aquatique.

La mise en place d'un **biofilm** s'effectue en 4 étapes:

- Le **transport** des bactéries sur les surfaces, par diffusion ou par flux turbulent.
- L'**adsorption**: pratiquement instantanée, elle survient souvent lors de la modification de la surface.
- L'**adhésion**: elle est due à différents types de forces qui interviennent entre la surface inerte et la cellule vivante (Van der Waals, électrostatiques et interactions hydrophobes). Elle est influencée par l'hydrophobicité des germes, variable selon les espèces et l'état physiologique du germe concerné, par les SPE, produites par les bactéries, qui peuvent aussi être favorables à la fixation d'autres espèces microbiennes, et par la température.
- Cette adhésion se fait en deux temps : l'**adhésion réversible** pendant laquelle la bactérie peut être facilement enlevée par simple rinçage, et l'**adhésion irréversible** qui nécessite des forces plus importantes pour retirer les bactéries (raclage, brossage).
- **La colonisation**: elle peut durer de quelques heures à quelques mois en fonction des conditions dans lesquelles se trouvent les micro-organismes. Il y a formation d'un réseau de micro-colonies qui se multiplient dans le réseau de polymères, nommé glycocalyx.

V.2. INTERACTION BACTERIES PATHOGENES-HOTE.

L'agent pathogène doit être capable [6] :

- d'être transporté vers l'hôte: **transmission** indirecte (sol-eau-nourriture), par contact direct, ou par vecteur ;
- d'**adhérer** et de **coloniser** ou d'**envahir** l'hôte, de concurrencer avec succès la microflore normale, de pénétrer activement (attaque-désorganisation surface cellulaire) ou passivement (blessure, lésion muqueuse, voie d'internalisation eucaryote) ;
- d'atteindre les tissus les plus profonds et de se disséminer, une fois dans épithélium ;
- de se **multiplier** sur ou dans l'hôte (trouver un environnement approprié à son développement et à sa reproduction) ;
- d'**échapper** aux mécanismes de défense de l'hôte ;
- de posséder la capacité mécanique, chimique ou moléculaire de **nuire** à l'hôte.

VI. RESISTANCE AUX AGENTS PHYSICO-CHIMIQUES

Le LPS est très résistant à de nombreux agents physiques ou chimiques [14].

Il ne peut pas être détoxifié par l'action conjointe du formol, du vieillissement et de la chaleur, et il n'est donc pas transformable en anatoxine contrairement à ce qui est observé pour certains toxiques protéiques.

L'hydrolyse par les acides ou les bases ou l'oxydation (par le permanganate, les hypochlorites....) du LPS est possible, mais il faut utiliser les agents chimiques dans des conditions telles qu'ils altèrent les autres constituants biologiques, et qu'ils modifient l'antigénicité du LPS.

La thermorésistance est très élevée. Pour détruire l'activité endotoxinique, il faut un chauffage de sept heures à 126°C ou un chauffage de trente minutes à 145°C en chaleur humide et, dans un four, il est nécessaire de chauffer sept heures à 170°C ou trente minutes à 250°C.

VII. LPS ET RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES [4]

Les antibiotiques les plus couramment testés sont ceux appartenant à la classe des **Bêta-lactamines**. Ces substances ont pour site d'action, les "penicillin - Binding - proteins" (PBP) situés sur le feuillet interne de la membrane cytoplasmique.

L'essentiel des résistances à ces antibiotiques a été observé chez les bactéries à Gram négatif [37, 53].

En effet, leur membrane externe, comportant des lipopolysaccharides en surface, constitue une barrière hydrophobe pour les bêta-lactamines qui sont des molécules hydrophiles [56]. Dès lors, leur passage occasionnel à travers la membrane n'est possible qu'au niveau des porines, canaux hydrophiles insérés dans la couche hydrophobe. C'est ainsi que l'on explique la résistance intrinsèque d'*Escherichia coli* à la pénicilline G, à la méticilline et à l'oxacilline et celle de *Pseudomonas aeruginosa* à la méticilline et à certaines céphalosporines.

D'autre part, l'espace périplasmique des bactéries à Gram négatif est plus étendu que celui des bactéries à Gram positif. Et c'est là que se trouvent les Bêta-lactamases, sur le passage obligé de la Bêta-lactamine vers sa cible.

Il est à noter en revanche, que les mutants rugueux de souches de bactéries à Gram négatif, perdent une bonne partie de cette fonction de barrière. Certains mutants apparaissent même plus sensibles aux antibiotiques hydrophiles [8].

A des conditions normales de croissance, le mutant LPXA₂ de *E.coli* qui produit des quantités très réduites de lipide A s'avère être très sensible à un certain nombre d'antibiotiques [61].

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'antibiotiques hydrophobes tels que la Rifampicine, l'Erythromycine, la Clindamycine et l'Acide fusidique sont 32 à plus de 128 fois plus basses que pour les souches parentales.

Pour des antibiotiques peptidiques tels que la Vancomycine et la Bacitracine, les CMI sont respectivement 32 et 256 fois plus basses.

VIII. METHODE D'ETUDE DES LPS

Les LPS sont des macromolécules complexes très hétérogènes [23, 41].

La caractérisation des LPS des entérobactéries a pu être réalisée après élimination du lipide A par hydrolyse acide douce et fractionnement de la portion polysaccharidique par chromatographie sur gel (colonne Séphadex) [23]

Cette technique a montré la grande diversité dans la composition des chaînes polysaccharidiques, et qu'une bactérie pouvait présenter à sa surface plusieurs types de lipopolysaccharides.

L'hétérogénéité ne pouvait donc être observée qu'après dégradation des extraits de LPS et fractionnement des LPS ainsi dégradés.

Du fait de la lourdeur et de la durée de cette procédure, il a été adopté une méthode plus simple d'analyse des différents types moléculaires de LPS (S, SR, R): l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en présence de dodécylsulfate de sodium (**SDS-PAGE**).

La méthode SDS-PAGE date de 1969 et a été initié par **WEBER et OSBORN [41]**.

C'est une électrophorèse de zone qui permet de séparer les molécules en fonction de leur taille: ceci aboutit à la caractérisation des molécules par la détermination de leurs poids moléculaires grâce à des marqueurs de taille.

Le gel de polyacrylamide peut avoir une porosité uniforme : la séparation est rapide (2 - 3 heures), mais elle n'est pas excellente, surtout pour les molécules de petite taille, du fait de la diffusion.

Le gel peut aussi être utilisé en gradient de concentration : la résolution est meilleure, mais elle dure plus longtemps (une nuit).

Le SDS est un détergent anionique qui a pour rôle :

- **D'uniformiser** la charge des molécules à séparer et
- De **solubiliser** la molécule de LPS. Le SDS se lie au lipide A qui constitue la région hydrophobe du LPS [23].

Les LPS séparés peuvent être détectés par diverses techniques, après avoir retiré le gel de la plaque de verre :

- coloration au bleu de coomassie.
- coloration au nitrate d'argent.
- coloration au bromure d'éthidium.

Dans les deux premiers cas, les bandes sont visibles tout de suite après la coloration.

Avec le bromure d'éthidium, elles sont visualisées en lumière ultraviolette ($\lambda = 300$ nm).

Les gels peuvent ensuite être photographiés ou séchés pour la conservation.

On peut également les conserver dans un sac plastique à fermeture contenant de l'eau.

IX. ESSAIS DE DETECTION DES ENDOTOXINES

BACTERIENNES

Les endotoxines bactériennes sont toxiques par voie injectable à l'état de traces :

Une injection d'endotoxines dans la circulation sanguine provoque à partir de 5 EU ou UI/Kg/h de poids corporel (ce qui correspond à environ 0,5 ng d'endotoxine purifiée) :

- Maux de tête
- Hypotension
- Coagulation intra vasculaire disséminée
- Choc pouvant aboutir à la mort

Il n'existe aucun traitement spécifique, on a uniquement des traitements symptomatiques. D'où la nécessité de les détecter dans les préparations injectables (solutés, vaccins, perfusions) [30].

IX.1. LES TESTS DE DETECTION

Les tests les plus utilisés sont [30] :

- ✓ Le premier test de détection est un essai in vivo qui consiste à la recherche d'un effet pyrogène chez le lapin
- ✓ Le deuxième test est un essai in vitro.

IX.1.1. Le test in vivo

Ce test est un essai de recherche des pyrogènes chez le lapin.

Il s'agit d'injecter des préparations injectables stériles dans la veine de l'oreille du lapin.

Le paramètre de détection est l'augmentation de la température

Ceci s'explique par le fait que la sécrétion de pyrogènes endogènes par les cellules phagocytaires (monocytes, macrophages) entraîne une action au niveau des centres thermorégulateurs de l'hypothalamus en provoquant une hyperthermie par l'intermédiaire de la sécrétion de prostaglandines.

La nature des pyrogènes influence le délai d'apparition de l'hyperthermie :

- Pour les pyrogènes endogènes, l'hyperthermie apparaît dès l'injection, puis on observe ensuite une décroissance rapide ;
- Pour les endotoxines, l'apparition de l'hyperthermie est décalée de trente minutes à une heure, puis elle perdure quatre heures après l'injection.

Mais il faut préciser que l'homme est plus sensible que le lapin aux substances pyrogènes, et notamment à l'injection d'endotoxines.

IX.1.2. Le test in vitro

L'essai au Lysat d'amoebocytes de limule(LAL).

Le dosage des endotoxines bactériennes se fait par une réaction enzymatique réalisée in vitro à l'aide d'un réactif, le réactif lyophilisé, le Lysat d'amoebocytes de limule (LAL).

➤ Le réactif au Lysat d'Amoebocytes de Limule

Un des aspects les plus intéressants du LAL est sa source [17]. Le LAL est produit à partir du sang ou hémolymphe d'un animal marin : *Limulus polyphemus* ou *Xyphosura polyphemus*, communément appelé le limule ou

crabe en fer à cheval. C'est un arthropode marin de la classe des Mérostomes, c'est à dire plus proche des araignées ou des scorpions que des crabes.

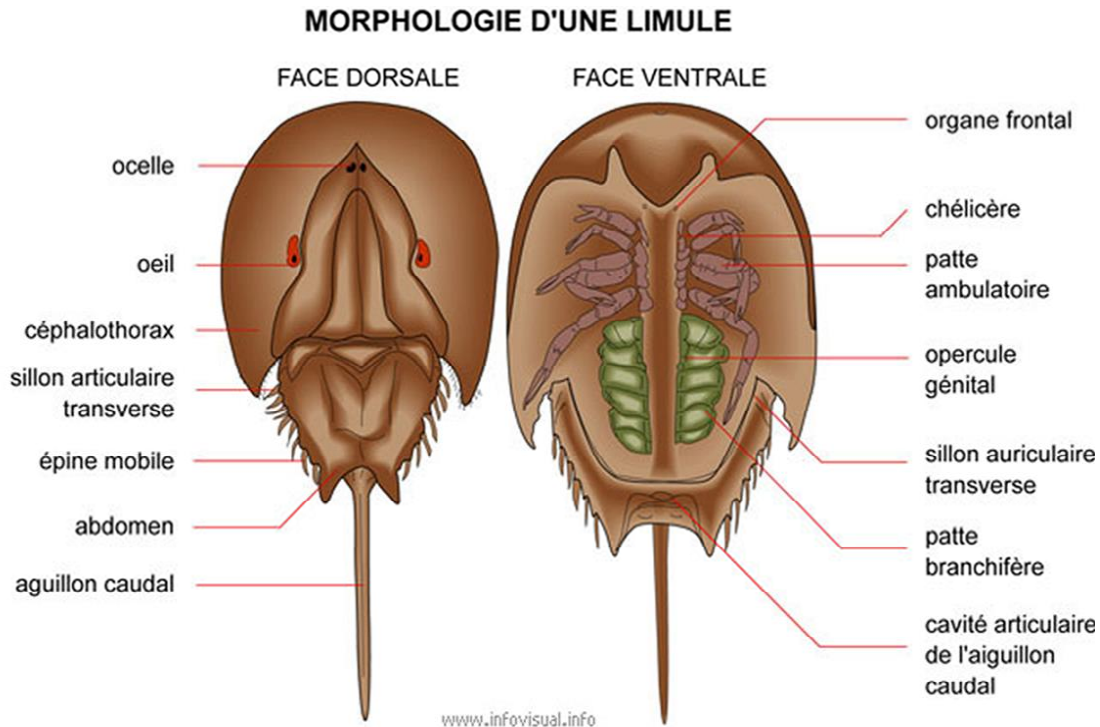


Figure 4 : Morphologie d'une Limule

Ils ont la particularité d'avoir un « système circulatoire ouvert » maintenant les organes dans le sang ou hémolymphe et les échanges (gaz, nutriments, déchets) s'y opère par simple diffusion. L'hémolymphe est composée de plasma contenant l'oxygène lié à l'hémocyanine (responsable de la couleur bleue, c'est une protéine riche en cuivre et non en fer) et des cellules appelées amœbocytes. Ces dernières sont de formes ovoïdes, granuleuses et nucléées, de la taille d'un macrophage humain [44].

Quand le limule est agressé, les amœbocytes perdent leurs formes ovoïdes pour devenir polylobulés ; ils s'agrègent et forment un caillot protecteur à l'endroit de l'agression.

Ce phénomène se produit aussi quand les limules sont agressés par les endotoxines des bactéries Gram négatif

Le sang de limule est extrêmement sensible à la présence de bactéries Gram négatif, de sorte que la coagulation du sang se produit au contact de très faibles quantités d'endotoxines injectées.

C'est **HOWELL**(1885) qui, pour la première fois, note le rôle primordial des amœbocytes dans la coagulation de l'hémolymphe de limule, en contact avec les endotoxines bactériennes. En effet, infestés par des bactéries Gram négatif, les limules mouraient par coagulation intra-vasculaire [30].

Ce phénomène de coagulation de l'hémolymphe de *Limulus polyphemus* est à la base de l'essai au lysat d'amœbocytes de limule (LAL) pour la détection in vitro des endotoxines bactériennes [16, 17].

Préparation du lysat

Les amœbocytes du sang de limule sont séparés par centrifugation, le culot est lavé puis lysé. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation et le surnageant est stocké à +4°C pendant plusieurs mois ou congelé à -20°. Le lysat est lyophilisé. La sensibilité de chaque lot est déterminée et parfois ajustée par élimination totale ou partielle d'un facteur inhibiteur par extraction chloroformique. Celle-ci a comme inconvénient de provoquer la précipitation de certaines protéines. Certains lysats sont tamponnés et des cations divalents, en particulier Mg^{2+} , sont ajoutés à différentes concentrations selon les réactifs.

Pour les techniques utilisant un substrat chromogène, le lysat est modifié en éliminant particulièrement la protéine coagulogène. Des études ont montré qu'une purification trop poussée du lysat diminue la sensibilité de la réaction, sans doute par élimination de certains facteurs activateurs.

➤ Le principe de la méthode LAL

Lors de la mise en présence du LAL et d'endotoxines, la formation de coaguline s'accompagne de l'apparition d'un trouble qui est à la base des méthodes LAL par turbidimétrie, tandis que les molécules de coaguline vont s'agréger pour former un gel qui est à la base des techniques LAL par gélification [17, 31].

En fait, le mécanisme de coagulation du sang de limule en présence d'endotoxines fait suite à une série de réactions enzymatiques. Les facteurs C et G, présents dans les amœbocytes, sont des facteurs initiateurs de la réaction et se lient respectivement avec les endotoxines et les (1-3)- β -D-glucanes (composés de la paroi cellulaire des moisissures). L'étape limitante de la réaction est le seuil d'activation du facteur C par le LPS, ce seuil étant directement lié à la concentration d'endotoxine. En plus du facteur C réagissant aux endotoxines, les amœbocytes contiennent du 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.

La protéine coagulagène peut être éliminée du réactif LAL et remplacée par un substrat chromogène spécifique de la coagulase ; la coagulase va scinder ce substrat en libérant une substance colorée, la paranitroaniline. C'est le principe des méthodes chromogéniques.

Pour toutes ces méthodes, la quantité de coagulase activée est proportionnelle à la quantité d'endotoxines présentes, ce qui permet selon les méthodes une détermination semi-quantitative (méthodes cinétiques, turbidimétriques et chromogéniques).

Les résultats obtenus par cette méthode LAL étaient historiquement donnés en unités de masse par volume de liquide ou d'air (ng/ml ou ng/m³) ou en masse

par masse(ng/mg). Cependant, des résultats très dispersés ont été obtenus pour des essais de dosages LAL avec des préparations de LPS différents mais aussi pour des endotoxines identiques mais avec des lots de LAL différents. Ceci rend les essais comparatifs interlaboratoires impossibles. Pour éliminer ces problèmes, la FDA a mis au point une endotoxine étalon de référence(RSE) à partir d'*Escherichia coli*. Cette préparation nommée EC-5 a un potentiel fixé à dix unités d'endotoxines (EUs) par échantillon ce qui est équivalent à 10 EU/ng d'*Escherichia coli*. Ainsi la FDA a exigé que tous les fabricants indiquent la sensibilité de chaque lot de LAL par rapport à l'étalon EC-5 RSE. Les fabricants indiquent généralement dans leur kit de dosage une endotoxine étalon de contrôle(CSE) calibrée à l'aide de RSE pour chaque lot de lysat. Les résultats des dosages sont donnés par rapport au RSE ce qui permet des essais comparatifs interlaboratoires. D'autres références ont été proposées par exemple au Japon, par l'organisation mondiale de la santé(OMS) ou par la pharmacopée européenne (EC-6), mais celles-ci ne sont pas clairement définies comme l'est EC-5.

Cette stratégie a été mise au point initialement pour les tests pyrogènes en industrie pharmaceutique et Pependorf (1986) l'a recommandée également pour les dosages d'endotoxines environnementales

- **Méthode par gélification**

Cette méthode repose sur la propriété qu'ont les endotoxines en très faible quantité de coaguler du LAL [42, 43].

Des quantités équivalentes de LAL et de solution à tester sont placées dans des tubes en verre apyrogène, mélangées puis mises en incubation à 37°C pendant une heure. A la fin de l'incubation les tubes sont retournés : si le gel s'est formé, 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. Par dilutions successives d'une endotoxine de référence dont la concentration est connue, on détermine le plus grand facteur de dilution pour lequel la coagulation se produit. En divisant ce facteur par la concentration d'endotoxine standard, on obtient la sensibilité du LAL. Une procédure similaire permet de calculer la concentration d'endotoxine dans un échantillon. En multipliant le plus grand facteur de dilution pour lequel la gélification se produit par la sensibilité du LAL, on peut extrapoler la concentration maximale d'endotoxine dans l'échantillon.

- **Méthode turbidimétrique**

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 floccule et sa turbidité est fonction de la concentration en endotoxines. Une courbe étalon est réalisée à l'aide de dilution successives d'une endotoxine de référence, cette courbe permettant de déterminer la concentration en endotoxines dans un échantillon.

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.

La plus grande source d'erreur en « point final » est le choix du moment de la lecture car la réaction se poursuit même si l'échantillon est refroidi. Une mesure

de densité anticipée minimise la concentration en endotoxines alors qu'une mesure tardive augmente artificiellement la concentration [42, 43].

La méthode turbidimétrique en cinétique s'affranchit de ces problèmes en fixant arbitrairement le début de la réaction à une augmentation déterminée de densité optique.

- **Méthodes chromogéniques**

Dans cette méthode, le LAL est combiné à une substance chimique : le 5-aminoacide-polypeptide (5-pep) lié à la paranitroaniline (pNA). Sous l'action de la coagulase activée la liaison 5-pep-pNA est coupée, libérant ainsi le pNA, qui peut être mesuré par spectrophotométrie (à 545 nm).

La vitesse de libération du pNA est fonction de la concentration en endotoxines dans l'échantillon.

La méthode chromogénique peut être adaptée en cinétique ou en « point final ».

- En point final, le LAL et l'échantillon sont incubés en même temps à 37°C de dix à trente minutes, puis on ajoute le substrat chromogène. Après trois minutes, la réaction est stoppée en ajoutant de l'acide acétique. L'absorbance est déterminée par spectrométrie.
- En cinétique, le LAL, l'échantillon et le substrat chromogène sont incubés en même temps. La réaction est suivie par spectrométrie pour déterminer le temps nécessaire à un changement d'absorbance. De même qu'en turbidimétrie, des courbes étalons sont réalisées, à l'aide de solutions de concentrations connues, pour évaluer ensuite la concentration en endotoxines dans l'échantillon.

IX.2. INTERFERENCES DANS LE TEST LAL

La plupart des essais 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 [31].

Les principales causes d'interférences sont :

- La température d'incubation : elle doit rester comprise entre 36 et 38°C ; la sensibilité du test est quasi nulle à 25°C. le LAL est détruit à une température supérieure à 45°C.
- Les conditions de pH : pour l'utilisation du LAL les conditions optimales de pH sont comprises entre un pH égal à 6,4 et un pH égal à 8 ; en dehors de cette fourchette, la sensibilité du LAL est altérée.
- L'adsorption des endotoxines,
- La présence de certains cations,
- La modification de l'enzyme ou de la protéine coagulase,
- L'activation du LAL,
- Les conséquences de la stérilisation

X. CRITERES DE LA VALIDATION [13, 55]

La validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves effectives que les prescriptions particulières d'une méthode analytique sont remplies. La validation a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique déterminée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faudra donc définir correctement les **conditions** dans lesquelles la méthode sera utilisée et le **but** dans lequel elle sera employée. En effet la validation inclut la spécification des exigences, la détermination des

caractéristiques des méthodes, la comparaison des exigences aux valeurs des caractéristiques de la méthode, ainsi qu'une déclaration relative à la validité.

Le choix d'une méthode est le point de départ véritable de la validation.

Si plusieurs méthodes sont concurrentes il faut sélectionner celle qui a le rapport coût-bénéfice le plus favorable (efficience).

Les performances d'une méthode peuvent s'exprimer à l'aide de caractéristiques telles que :

- La linéarité ou domaine d'analyse ;
- La limite de détection;
- La précision ;
- La répétabilité et la reproductibilité ;
- La spécificité et la sélectivité ;
- La sensibilité ;
- L'exactitude ou la justesse.

Ces caractéristiques de validation sont applicables aux dosages biologiques mais ne doivent pas nécessairement être toutes étudiées pour chaque procédure d'analyse à valider. Les objectifs de la méthode doivent guider le choix des caractéristiques à évaluer.

Pour un essai limite comme c'est le cas pour l'essai de recherche des endotoxines il faudra déterminer :

X.1.LA LIMITE DE DETECTION

C'est la plus petite quantité ou concentration qui peut être détectée, mais non quantifiée, avec un risque d'erreur connu [15, 45].

X.2. SPECIFICITE

Une méthode est spécifique lorsqu'elle permet de mesurer l'analyte avec la garantie que le signal instrumental ne provient que de l'analyte.

X.3. REPETABILITE

La mesure de la fidélité, lorsque les mesures sont faites par le même opérateur, sur un même instrument, avec une méthode unique et dans un délai court.

X.4. REPRODUCTIBILITE

Mesure de la fidélité, lorsque n'importe quelle condition change : plusieurs opérateurs et/ou instruments et/ou méthodes d'analyses et/ou délais d'exécution....

Il suffit de calculer la moyenne et l'écart type des valeurs obtenues pour un même spécimen au cours des séries indépendamment effectuées en exploitant les formules :

$$m = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m)^2}{n-1}}$$

m = moyenne

n = nombre total de valeurs

x_i = chaque valeur

S = écart-type

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL



Validation du contrôle des endotoxines bactériennes par la méthode au *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) test
-Application au VACCIN AMARIL STABILISE-

I.PRESENTATION DU CADRE D'ETUDE.

Notre étude a été réalisée au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (LNCM) qui se situe en face de l'hôpital Aristide Le Dantec. Ce laboratoire comporte des unités qui permettent d'assurer le contrôle de qualité des différentes formes pharmaceutiques disponibles sur le marché sénégalais :

- Le bureau de physico-chimie ;
- Le bureau de microbiologie ;
- Le bureau des vaccins ;
- Le bureau d'assurance-qualité (AQ).

La mission du laboratoire est le contrôle technique des médicaments en relation avec la Direction de la Pharmacie et des Laboratoires (DPL). Il est dirigé par un pharmacien chef qui est aidé dans sa tâche par d'autres pharmaciens responsable de section.

Nous avons eu à travailler essentiellement dans les locaux réservés à la section vaccin.

La section vaccin partage ses locaux avec la section microbiologie et dispose :

- d'un bureau pour le pharmacien responsable ;
- d'une salle pour les manipulations de la section vaccin ;
- d'une salle pour les manipulations de la section microbiologie ;
- d'une salle d'incubation ;
- d'une laverie.

II. MATERIELS

II.1. APPAREILLAGE ET VERRERIE

- Agitateur type Vortex
- Agitateur pour plaque
- Autoclave stérilisant
- Bain marie
- Balance de précision
- Centrifugeuse
- Chronomètre
- Congélateur
- Etuve
- Etuve à CO₂
- Four micro-onde
- Hotte à flux laminaire
- Loupe
- Microscope à contraste de phase
- Microscope optique
- ph mètre
- Pince
- Portoirs
- Réfrigérateur 70°C, + 4°C
- Ampoule à décanter

- Ances
- Becher
- Boite de pétri
- Cupule
- Disques
- Ecouvillons
- Entonnoir
- Eprouvette
- Erlenmeyer
- Fiole de kitassato
- Flacons de 60ml, 100ml, 125ml, 500ml, 1000ml
- Mortier et pilon
- Pipette 1ml, 5ml, 10ml, 20ml
- Tubes coniques
- Tubes à essai
- Tubes à hémolyse

II.2. PRECAUTIONS DE REALISATION DE L'ESSAI

II.2.1. Test préalable de stérilité

Pendant une dizaine de jours nous avons procédé à la stérilisation de la salle en nettoyant tous les jours la paillasse et la hotte avec de l'alcool. Nous avons allumé la lampe UV chaque soir. Nous avons procédé fréquemment à des contrôles de stérilité en déposant une boîte de pétri avec un milieu de culture

dans la hotte et sur la paillasse pendant quinze minutes puis les boîtes sont incubées à 37°C jusqu'au lendemain. Aucune colonie ne pousse nous pouvons dire que notre hotte est stérile. La veille de la manipulation on procède à la stérilisation du matériel (porte tube, pipette Eppendorf, ciseaux.....) en autoclavant.

II.2.2. Vaccin Amaril Stabilisé.

Toutes les préparations parentérales (préparations injectables, préparations pour perfusion) doivent faire l'objet d'un essai des endotoxines bactériennes. Mais pour notre étude nous avons principalement utilisé le VACCIN AMARIL STABILISE (contre la fièvre jaune) de l'Institut Pasteur de Dakar.

III. VALIDATION DU DOSAGE DES ENDOTOXINES PAR LA METHODE LAL

III.1. MATERIEL

- Kit de dosage des endotoxines Bio WHITTAKER contenant :
 - solution d'endotoxine de référence
 - Lysat d'Amoebocytes de Limule (LAL) lyophilisé
 - Eau LAL
 - Tubes de réaction apyrogène
- Solvant (NaCl 0,9%)
- 2 portes tubes
- Bain Marie régulé à 37°C sans agitation
- Pipettes automatiques réglables P200 et P20

- Cône de distribution apyrogène par pipette de 10 et 100µl
- Chronomètre
- Hotte à flux laminaire
- VACCIN AMARIL
- Eau PPI

III.2. METHODE

Cette procédure est destinée à décrire la méthode de confirmation de la sensibilité du réactif LAL, la vérification de l'absence d'interférences du vaccin sur le test.

III.2.1. Qualification initiale (Validation de la sensibilité du Lysat)

➤ Préparation de l'endotoxine de contrôle (CSE)

Nous avons reconstitué le flacon d'endotoxine de contrôle par 5ml d'eau LAL.

Nous avons vortexé la solution obtenue pendant exactement 10 minutes.

Ainsi nous avons obtenu une solution à X EU/ml (***solution A***)

Une dilution de 1/X à partir de la ***solution A*** a été réalisé en transférant 0,1 ml de cette ***solution A*** dans 0,1 (X-1) ml d'eau LAL.

Soit C1 la concentration de la ***solution A*** $C1 = X \text{ EU/ml}$

Soit C2 la concentration de la ***solution B*** $C2 = 1 \text{ EU/ml}$

Soit V1 le volume de la ***solution A***

Le volume de la ***solution B***, $V = V1 + V2$

Avec V_2 = au volume d'eau à compléter pour passer de la *solution A* à la *solution B*.

$$C_1V_1 = C_2V,$$

$$C_1V_1 = C_2(V_1 + V_2),$$

$$C_1V_1 = C_2V_1 + C_2V_2,$$

$$C_2V_2 = C_1V_1 - C_2V_1$$

$$C_2V_2 = V_1(C_1 - C_2)$$

$$V_2 = V_1/C_2(C_1 - C_2)$$

$$V_2 = V_1(C_1/C_2 - 1) \quad (1)$$

On sait que : $C_1 = X$ EU/ml ; $C_2 = 1$ EU/ml

(1) devient

$$V_2 = V_1(X - 1)$$

La dilution obtenue titre 1EU/ml (*solution B*). Nous avons vortexé la *solution B* pendant une minute.

A partir de la *solution B*, nous avons effectué une série de 4 dilutions au demi en vortexant une minute entre chaque dilution. La sensibilité du lysat a été encadré par les concentrations des dilutions obtenues, donc de 4λ à $\lambda/4$

Tableau I : Séries de dilution au demi pour λ

tubes	Volumes de la solution d'endotoxines	Volume d'eau LAL	Concentration d'endotoxines
1	1,0ml de solution B	0ml	1EU/ml
2	1,0ml de solution B	1ml	0,5EU/ml
3	1,0ml du tube 2	1ml	0,25EU/ml
4	1,0ml du tube 3	1ml	0,125EU/ml
5	1,0ml du tube 4	1ml	0,065 EU/ml

➤ Préparation des tubes de réaction et dosage

Nous avons distribué dans 4 tubes de réaction 100 μ l de chacune des dilutions, et dans un tube témoin négatif 100 μ l d'eau LAL. La même opération a été répétée pour les autres concentrations 0,5EU/ml, 0,25EU/ml, 0,125EU/ml et 0,065EU/ml. On a eu au total 21 tubes de réaction.

Ensuite les tubes de réaction ont été préincubés au bain marie sans agiter, thermostat à 37° pendant 5 minutes.

Pendant ce temps nous avons reconstitué un flacon de lysat par la quantité indiquée sur le flacon, puis mélangé doucement sans vortexer jusqu'à dissolution complète.

Après les 5 minutes d'incubation le porte tube a été sorti du bain marie avec l'ensemble des tubes. Nous avons positionné dans le bain marie un porte tube équivalent au premier. A l'aide d'une pipette, nous avons distribué dans chaque tube 100 μ l de LAL. Ensuite nous avons agité légèrement chaque tube avant de le replacer dans l'incubateur.

Enfin nous avons incubé à 37°C pendant 1 heure en évitant toute vibration autour de l'incubateur pendant toute la durée de la réaction.

➤ **Lecture.**

Au bout d'une heure d'incubation on retourne chaque tube délicatement et une seule fois à 180°.

Si un gel ferme tenant au fond du tube la réaction est positive.

Si le gel coule le long de la paroi du tube la réaction est négative.

➤ **Résultats et Analyses.**

Calcul de la sensibilité expérimentale du lysat :

- Déterminer pour chaque série la concentration minimale d'endotoxines donnant un résultat positif = **point final**.
- Déterminer le log 10 de chaque point final.
- Faire la moyenne σ (géométrique) des logarithmes à base 10 des points finaux.
- La sensibilité est obtenue en prenant l'antilogarithme de cette moyenne :

$\lambda \text{ exp.} = \text{Antilog}(\sigma) \lambda \text{ exp.}$ Doit être comprise dans l'intervalle $\lambda / 2 - 2\lambda$

III.2.2. Calibration RSE/CSE

RSE (Endotoxine Standard de Référence).

CSE (Endotoxine Standard de Contrôle). Endotoxines des coffrets de réactifs ;

Un certificat qualité de l'endotoxine indique l'activité de la CSE par rapport à l'endotoxine de référence (RSE) en EU ou UI/ml avec le lot de réactif LAL utilisé

III.2.3.Essai de recherche des interférences

➤ Détermination de la DMS

La dilution maximale significative est la dilution du vaccin à utiliser dans l'essai pour pouvoir établir, avec un niveau d'assurance maximale, qu'un résultat négatif signifie que la teneur en endotoxines du vaccin est inférieure à la limite en endotoxines, et qu'un résultat positif signifie que le lysat a réagi à une concentration d'endotoxines au moins égale à la limite en endotoxines.

Pour un produit liquide et un lysat de sensibilité égale à λ UE/ml, la DMS est égale à : $DMS = \text{limite en endotoxines} / \lambda$

➤ Recherche des interférences du vaccin sur le test

Ce test a pour but de vérifier si le vaccin interfère (inhibition ou activation) ou non sur la réaction endotoxine –LAL. Cette recherche se fera sur un lot puis sur trois lots de vaccin différent.

• Techniques :

Nous avons préparé une série de dilution au demi de l'endotoxine CSE dans l'eau LAL, et préparé aussi une série de dilutions au même concentration pour le vaccin.

Les deux séries ont été testées en parallèle par le test LAL, la gamme dans l'eau a été testée en duplicate et celle dans le vaccin en quadruplicate.

- **Interprétation**

Les sensibilités expérimentales déterminées dans les deux cas doivent être comprises dans l'intervalle $\lambda/2 - 2\lambda$.

- Si les sensibilités expérimentales « lysat – eau » et « lysat– vaccin » sont comprises dans l'intervalle $\lambda/2 - 2\lambda$, le vaccin n'interfère pas dans la réaction LAL – endotoxine et peut être donc dosé en routine à la dilution utilisée dans le test.
- Si la sensibilité déterminée dans le produit est inférieure à $\lambda/2$, alors le vaccin est activateur.
- Si la sensibilité déterminée dans le produit est supérieure à 2λ , alors le vaccin est inhibiteur.

Dans les deux cas le vaccin ne pourra être testé par LAL qu'après pré traitement.

Moyenne = somme des log10 point final/N

N=nombre de log10 point final

Sensibilité expérimentale $\lambda_{exp.} = \text{Antilog (moyenne)} = 10^{\text{moyenne}}$

Cette sensibilité expérimentale doit être comprise dans l'intervalle $\lambda/2-2\lambda$ bornes incluses.

IV. ESSAI DES ENDOTOXINES PAR LA METHODE

LAL

IV.1. PREPARATION DE L'ENDOTOXINE STANDARD

DE CONTROLE (CSE)

Le flacon d'endotoxine étalon a été reconstitué par 5ml d'eau LAL. (La solution d'endotoxine obtenue peut se conserver pendant un mois entre +2 et +8°C.)

Nous avons ensuite vortexer la solution obtenue pendant exactement 10 minutes.

NB : Si l'endotoxine a déjà été reconstituée vortexer 5 min le flacon.

Nous avons ainsi obtenu une solution à X-EU/ml (*solution A*)

La *solution A* a été diluée de façon à obtenir une concentration finale de 20λ.

Nous avons vortexé la solution diluée pendant une minute.

Soit $C_1 = X$ EU/ml, la concentration de la *solution A*

Soit $C_2 = 20\lambda$, la concentration de la *solution B*.

Soit V_1 , le volume de la *solution A*.

Soit V le volume de la *solution B* avec $V = V_1 + V_2$

en sachant que V_2 est le volume d'eau à compléter pour passer de la *solution A* (C_1) à la *solution B* (C_2)

C'est ce volume V_2 Qu'on veut calculer.

On sait que $C_1 V_1 = C_2 V$ (1)

$V = V_1 + V_2$ donc on aura $C_1 V_1 = C_2 (V_1 + V_2)$

$$C_1 V_1 = C_2 V_1 + C_2 V_2$$

$$C_2V_2 = C_1V_1 - C_2V_1$$

$$C_2V_2 = V_1 (C_1 - C_2)$$

$$V_2 = V_1/C_2 (C_1 - C_2) \quad (2)$$

$C_1 = \text{XEU/ml}$ et $C_2 = 20 \lambda$

(2) devient $V_2 = V_1/20\lambda (X - 20 \lambda)$

Enfin on aura

$$V_2 = V_1 (X/20 \lambda - 1)$$

Cette dilution servira à préparer pour chaque dosage le contrôle positif à 2λ dans l'eau (LAL) et les deux tubes contrôles positifs produit ou P.P.C chargé par 2λ .

IV.2. MODE OPERATOIRE

Chaque dosage d'échantillon devra comporter :

- 1 tube contrôle négatif : Eau LAL
- 1 tube contrôle positif : Eau LAL + Endotoxine 20λ
- 2 tubes contrôle positif vaccin (duplicat) : Vaccin + Endotoxine 20λ
- 2 tubes dosage vaccin (duplicat) : Vaccin

Dans les tubes de réaction, nous avons distribué selon le schéma suivant :

- l'eau LAL
- le Vaccin à doser à la dilution déterminée dans l'essai d'inhibition/activation
- et l'endotoxine étalon à 20λ

Il ne faut pas oublier de vortexer l'endotoxine avant de prélever.

Tableau II : Mode de distribution.

Tubes	Eau LAL	Vaccin à la dilution choisie	Endotoxine 20λ
Contrôle négatif	100μl	-	-
Contrôle positif	100μl	-	10μl
Dosage 1	-	100μl	-
Dosage 2	-	100μl	-
PPC1	-	100μl	10μl
PPC2	-	100μl	10μl

Les tubes PPC ont été vortexé pendant quelques secondes afin de bien mélanger la surcharge ajoutée à l'échantillon.

Ensuite nous avons pré incubé les tubes au Bain marie sans agiter pendant 5 minutes, (le thermostat réglé à 37° +/- 1°C).

Pendant ce temps 1 flacon de lysat a été reconstitué par la quantité sur le flacon. Nous avons mélangé doucement sans vortexer jusqu'à dissolution complète.

Après les 5 minutes d'incubation, le porte tube a été sorti du bain marie avec l'ensemble des tubes.

Un porte tube équivalent au premier a été positionné dans le bain marie.

A l'aide d'une pipette GILSON P200 nous avons distribué dans chaque tube 100μl de LAL.

Ensuite nous avons agité légèrement chaque tube avant de le replacer dans l'incubateur.

L'incubation a été faite pendant 1 heure à 37°C en évitant toute vibration autour de l'incubateur pendant toute la durée de la réaction.

NB :

Le chronomètre a été déclenché dès que le premier tube est remis à incuber.

Il faut respecter scrupuleusement les intervalles réguliers de distribution ; soit 15 secondes par intervalle.

IV.3. LECTURE

Après une heure d'incubation, chaque tube a été retourné délicatement et une seule fois à 180°.

Une réaction positive est signée par un gel ferme tenant au fond du tube.

La réaction est négative si le gel coule le long de la paroi du tube.

N.B. :

Attention à bien respecter l'ordre de distribution lors de la lecture ainsi que les intervalles de distribution car si l'heure d'incubation est prolongée, le gel devient fragile ce qui peut entraîner un faux résultat.

IV.4. INTERPRETATION DES RESULTATS.

Le contrôle négatif ne doit pas former de gel. Les contrôles positifs (eau LAL + PPC) doivent donner un résultat positif c'est à dire 1 gel ferme tenant au fond du tube.

- Si les 2 tubes dosage sont négatifs, le vaccin testé renferme moins de (λ x facteur de dilution du vaccin) EU/ml.
- Si les 2 tubes dosages sont positifs, le vaccin testé renferme plus de (λ x facteur de dilution du vaccin) EU/ml.
- Si un seul des tubes dosage est positif il faut répéter l'essai.

RESULTATS



V. RESULTATS ET ANALYSES

V.1 PRECAUTIONS DE REALISATION DE L'ESSAI

V.1.1 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 doivent être respectées. L'essai doit être effectué dans des conditions permettant d'éviter la contamination microbienne, aucune souillure n'est tolérée. Après incubation à 37°C nous pouvons constater qu'aucune colonie n'a poussé dans nos boîtes de pétrie. Donc nous pouvons utiliser la hotte et la paillasse pour procéder à l'essai des endotoxines bactériennes.

V.1.2. Vaccins

Pour notre étude nous avons utilisé le VACCIN AMARIL STABILISE de l'Institut Pasteur de Dakar. C'est un vaccin lyophilisé thermostabilisé, produit à partir de la souche atténuée 17 D Rockfeller sur embryon de poulet exempt de germes pathogènes spécifiés.

Le vaccin se présente en ampoule de 5, 10 ou 20 doses et sont conditionnées en étuis de 10 ampoules.

Nous avons travaillé avec le lot de référence 1489, le lot 1846, le lot 1847, le lot 1850. Tous ces lots sont à 20 doses.

Chaque ampoule sera reconstituée avec 10 ml d'eau physiologique.

V.2. TEST DE CONFORMITE

V.2.1. *Qualification initiale (validation de la sensibilité du Lysat)*

➤ Préparation de l'endotoxine de contrôle (CSE)

Nous avons reconstitué le flacon d'endotoxine étalon par 5ml d'eau LAL. Nous avons vortexé cette solution pendant exactement dix minutes.

Nous avons ainsi obtenu une solution à 20 EU/ml (*solution A*).

➤ Préparation de la gamme d'étalonnage

Pour obtenir la *solution B* qui a une concentration de 1 EU/ml nous avons fait une dilution de 1/20 à partir de la *solution A* en transférant 0,1 ml de cette solution A dans 1,9 ml d'eau LAL.

Le reste de la solution d'endotoxine peut se conserver pendant un mois entre +2 et +8°C.

A partir de la *solution B* nous avons fait une série de quatre dilutions au demi :

Tableau III : Série de dilution au demi pour la qualification initiale

tubes	Volume de la solution d'endotoxine	Volume d'eau LAL	Concentration d'endotoxine
1	1ml de solution B	0ml	1EU/ml
2	1ml de solution B	1ml	0,5EU/ml
3	1ml du tube 2	1ml	0,25EU/ml
4	1ml du tube 3	1ml	0,12EU/ml
5	1ml du tube 4	1ml	0,06EU/ml

➤ **Lecture.**

Après l'heure d'incubation on retourne chaque tube délicatement à 180°.

Un gel ferme au fond du tube qui signe une réaction positive.

Un gel qui coule le long de la paroi signe une réaction négative.

Tableau IV : Résultats de la qualification initiale

Série	4λ 1EU/ml	2λ 0,5EU/ml	λ 0,25EU/ml	λ/2 0,125EU/ml	λ/4 0,0625EU/ml	Témoin négatif
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	-	-	
3	+	+	-	-	-	
4	+	+	+	-	-	

➤ **Expression des résultats.**

Calcul de la sensibilité expérimentale du lysat (λ) :

Nous avons déterminé pour chaque série la concentration minimale d'endotoxine donnant un résultat positif = **point final**.

Puis nous avons déterminé les logarithmes à base 10 de chaque point final.

Ensuite nous avons fait la moyenne σ (géométrique) des logarithmes à base 10 des points finaux.

$$\text{Moyenne} = \frac{\sum \text{Log10}(\text{point final})}{N}$$

N=nombre des Log10

N = 4

$$\sigma = -0,527$$

On calcule également l'écart type (S)

$$\text{Ecart type} = \sqrt{\frac{\sum (X_i - m)^2}{n-1}}$$

S = 0,151

Nous avons calculé la sensibilité expérimentale en prenant l'antilogarithme de la moyenne :

$$\lambda \text{ exp.} = \text{Antilog} (\sigma)$$

$$\lambda \text{ exp} = \text{Antilog} (-0,527)$$

$$\lambda \text{ exp} = 0,29 \text{ EU/ml}$$

Tableau V: Calcul de la sensibilité expérimentale

Série	Point final	Log10(point final)	Moyenne	Sensibilité expérimentale
1	0,25	-0,602	-0,527	0,29
2	0,25	-0,602		
3	0,5	-0,301		
4	0,25	-0,602		

➤ **Interprétation des résultats**

La sensibilité expérimentale obtenue est bien comprise dans l'intervalle fixé :

$$\lambda / 2 \leq \lambda \text{ exp.} \leq 2\lambda$$

$$0,125\text{EU/ml} \leq 0,29\text{EU/ml} \leq 0,5\text{EU/ml}$$

De plus on a une variabilité acceptable ; S = 0,151.

On sait que pour n=4 l'écart type doit être inférieur à 0,365.

Pour les dosages ultérieurs réalisés avec le même lot de lysat c'est la sensibilité du fabricant (0,25) qui devra être utilisée et non celle déterminée expérimentalement.

V.2.2. Calibration CSE/RSE

Calibration de l'endotoxine de contrôle (CSE) par rapport à l'endotoxine de référence (RSE) Un certificat de qualité indique l'activité de la CSE par rapport à l'endotoxine de référence (RSE) en EU ou UI/ml avec le lot de réactif LAL utilisé.

V.3 ESSAI DE RECHERCHE DES INTERFERENCES

Avant toute chose pour la recherche des interférences il ya des calculs pré-requis :

- Calculer la concentration limite en endotoxine (ELC) ;
- Calculer la dilution maximum significative (DMS).

La limite en endotoxines est fonction du produit et de sa voie d'administration. Pour le VACCIN AMARIL STABILISE de l'Institut Pasteur la valeur en endotoxines doit être inférieure à 5 UI/dose.

On donc pas besoin de calculer l'ELC.

V.3.1. Détermination de la dilution maximale significative (DMS)

Pour le VACCIN AMARIL STABILISE la limite en endotoxine est de 5 UI/dose. Le vaccin est à 20 doses qu'on reconstitue avec 10 ml d'eau physiologique.

La limite en endotoxine exprimée en UI/ml est de 100 UI/10ml ou 10 UI/ml.

DMS =limite en endotoxine/sensibilité du lysat.

DMS =10/0,25

DMS =40

➤ **Préparation du vaccin.**

Après avoir reconstitué les vaccins (lot 1489 référence, lot 1846, lot 1847, lot 1850) avec 10 ml d'eau physiologique. La solution obtenue sera diluée dans l'eau LAL au maximum jusqu'à la DMS.

V.3.2. Recherche des interférences du vaccin sur le test pour un lot

La **solution A** a déjà été reconstituée on la vortex pendant cinq minutes.

On transfère 0,1 ml de cette solution A dans 1,9 ml d'eau LAL.

Nous avons préparé une série de dilution au demi de l'endotoxine CSE dans l'eau LAL, de manière à obtenir les concentrations de 2λ - λ - $\lambda/2$ - $\lambda/4$.

Nous avons préparé une solution d'endotoxines à 20λ (5 EU/ml) en prélevant 0,1ml de la **solution A** plus 0,3 ml d'eau LAL

On prélève 0,1 ml de cette solution au quelle on ajoute 0,9 ml de vaccin (on obtient ainsi une solution à 2λ).

Nous avons ensuite préparé une série de dilution aux mêmes concentrations pour le vaccin (2λ - λ - $\lambda/2$ - $\lambda/4$).

Les deux séries ont été testées en parallèle par le test LAL, la gamme dans l'eau a été testée en duplicat et celle dans le vaccin en quadruplicat.

➤ **Lecture**

Après l'heure d'incubation on retourne chaque tube délicatement à 180° .

Un gel ferme au fond du tube qui signe une réaction positive.

Un gel qui coule le long de la paroi signe une réaction négative.

Tableau VI : Résultat de la recherche d'interférence pour un lot

série	2λ 0,5EU/ml	λ 0,25EU/ml	$\lambda/2$ 0,125EU/ml	$\lambda/4$ 0,0625EU/ml
H ₂ O	+	-	-	-
	+	+	-	-
VACCIN	+	+	+	-
	+	+	-	-
	+	+	-	-
	+	+	-	-

➤ **Expression des résultats.**

Nous avons déterminé pour chaque série la concentration minimale d'endotoxine donnant un résultat positif = **point final**.

Puis nous avons déterminé les logarithmes à base 10 de chaque point final.

Ensuite nous avons fait la moyenne géométrique des logarithmes à base 10 des points finaux.

$$\text{Moyenne} = \frac{\sum \text{Log}_{10} (\text{point final})}{N}$$

N=nombre des Log₁₀

N pour la gamme dans l'eau est égal à 2.

N pour la gamme dans le vaccin est égal à 4.

Moyenne eau = - 0,45

Moyenne vaccin = - 0,67

Nous avons calculé également l'écart type (S)

$$\text{Ecart type} = \sqrt{\frac{\sum (X_i - m)^2}{n-1}}$$

Pour la gamme dans l'eau **Se = 0,21**

Pour la gamme dans le vaccin on a: **Sv = 0,15**

Nous avons calculé la sensibilité expérimentale en prenant l'antilogarithme de la moyenne :

$$\lambda \text{ exp.} = \text{Antilog} (\sigma)$$

$\lambda \text{ exp.eau.} = 0,35 \text{ EU/ml}$

$\lambda \text{ exp.vac} = 0,21 \text{ EU/ml}$

Tableau VII : Calcul des sensibilités expérimentales

série	Point final	Log10(point final)	Moyenne	Sensibilité expérimentale
H₂O	0,5	-0,301	-0,45	0,35
	0,25	-0,602		
VACCIN	0,125	-0,903	-0,67	0,21
	0,25	-0,602		
	0,25	-0,602		
	0,25	-0,602		

➤ **Interprétation des résultats.**

Les sensibilités expérimentales déterminées dans les deux cas sont bien comprises dans l'intervalle fixé :

$$\lambda/2 \leq \lambda_{\text{exp}} \leq 2\lambda$$

$$0,125\text{EU/ml} \leq \lambda_{\text{exp}} \leq 0,5\text{EU/ml}$$

$$\lambda_{\text{expH}_2\text{O}}=0,35\text{EU/ml}$$

$$\lambda_{\text{exp vaccin}}=0,21\text{EU/ml}$$

$$0,125\text{EU/ml} \leq 0,35\text{EU/ml} \leq 0,50\text{EU/ml}$$

$$0,125\text{EU/ml} \leq 0,21\text{EU/ml} \leq 0,50\text{EU/ml}$$

Les sensibilités expérimentales « lysat - eau » et « lysat - vaccin » sont comprises dans l'intervalle $\lambda/2 - 2\lambda$, le vaccin n'interfère pas dans la réaction LAL – endotoxine et peut être donc dosé en routine à la dilution utilisée dans le test.

V.3.3. Recherche d'interférences du vaccin sur le test pour trois lots(1846,1847,1850).

➤ Préparation des vaccins.

Après avoir reconstitué les vaccins (lot 1846, lot 1847, lot 1850) avec 10 ml d'eau physiologique. La solution obtenue sera diluée dans l'eau LAL au maximum jusqu'à la DMS.

➤ Préparation de la gamme d'étalonnage

La **solution A** a déjà été reconstituée on la vortex pendant cinq minutes.

On transfère 0,1 ml de cette solution A dans 1,9 ml d'eau LAL.

Nous avons préparé une série de dilution au demi de l'endotoxine CSE dans l'eau LAL, de manière à obtenir les concentrations de 2λ - λ - $\lambda/2$ - $\lambda/4$.

Nous avons préparé une solution d'endotoxines à 20λ (5 EU/ml) en prélevant 0,1ml de la **solution A** plus 0,3 ml d'eau LAL

On prélève 0,1 ml de cette solution au quelle on ajoute 0,9 ml de vaccin (on obtient ainsi une solution à 2λ).

Nous avons ensuite préparé une série de dilution aux mêmes concentrations pour les vaccins (2λ - λ - $\lambda/2$ - $\lambda/4$).

Les quatre séries ont été testées en parallèle par le test LAL, la gamme dans l'eau a été testée en duplicat et celles dans les vaccins en quadruplicat.

➤ Lecture.

Après l'heure d'incubation on retourne chaque tube délicatement à 180° .

Un gel ferme au fond du tube qui signe une réaction positive.

Un gel qui coule le long de la paroi signe une réaction négative.

Tableau VIII : Résultat de la recherche d'interférence sur trois lots.

série	2λ 0,5EU/ml	λ 0,25EU/ml	$\lambda/2$ 0,125EU/ml	$\lambda/4$ 0,0625EU/ml
H ₂ O	+	+	-	-
	+	+	-	-
Vaccin A	+	-	-	-
	+	+	+	-
	+	+	-	-
	+	-	-	-
Vaccin B	+	+	-	-
	+	-	-	-
	+	-	-	-
	+	+	-	-
Vaccin C	+	+	+	-
	+	+	-	-
	+	+	-	-
	+	+	-	-

➤ **Expression des résultats.**

Nous avons déterminé pour chaque série la concentration minimale d'endotoxine donnant un résultat positif = **point final**.

Puis nous avons fait les mêmes calculs que précédemment.

Tableau IX : Calcul des sensibilités expérimentales

série	Point final	Log10(point final)	Moyenne	Sensibilité expérimentale
H₂O	0,25	-0,602	-0,602	0,25
	0,25	-0,602		
Vaccin A	0,5	-0,301	-0,52	0,29
	0,125	-0,903		
	0,25	-0,602		
	0,5	-0,301		
Vaccin B	0,25	-0,602	-0,45	0,35
	0,5	-0,301		
	0,5	-0,301		
	0,25	-0,602		
Vaccin C	0,125	-0,903	-0,67	0,21
	0,25	-0,602		
	0,25	-0,602		
	0,25	-0,602		

Nous pouvons ainsi calculer la variance des n_j répétitions (S_j^2) et l'écart type (S_j).

$$\text{Moyenne } m_j = \frac{\lambda_a + \lambda_b + \lambda_c}{3}$$

$$S_j^2 = \frac{(\lambda_a - m_j) + (\lambda_b - m_j) + (\lambda_c - m_j)}{3 - 1}$$

$$S_j = \sqrt{S_j^2}$$

Tableau X : Résultat de la reproductibilité

lot	Sensibilité λ	m_j	S_j^2	S_j
Vaccin A	0,29	0,28	0,005	0,07
Vaccin B	0,35			
Vaccin C	0,21			

➤ **Interprétation des résultats.**

Les sensibilités expérimentales déterminées dans les 4 cas sont bien comprises dans l'intervalle fixé :

$$\lambda/2 \leq \lambda_{\text{exp}} \leq 2\lambda$$

$$0,125\text{EU/ml} \leq \lambda_{\text{exp}} \leq 0,5\text{EU/ml}$$

$$\lambda_{\text{expH}_2\text{O}} = 0,25\text{EU/ml}$$

$$\lambda_a = 0,29 \text{ EU/ml}$$

$$\lambda_b = 0,35 \text{ EU/ml}$$

$$\lambda_c = 0,21 \text{ EU/ml}$$

$$0,125\text{EU/ml} \leq 0,29\text{EU/ml} \leq 0,50\text{EU/ml}$$

$$0,125\text{EU/ml} \leq 0,35\text{EU/ml} \leq 0,50\text{EU/ml}$$

$$0,125\text{EU/ml} \leq 0,21\text{EU/ml} \leq 0,50\text{EU/ml}$$

Les sensibilités expérimentales « lysat – eau » et « lysat – vaccin » sont comprises dans l'intervalle $\lambda/2 - 2\lambda$, le vaccin n'interfère pas dans la réaction LAL – endotoxine et peut être donc dosé en routine à la dilution utilisée dans le test.

L'écart type est faible, donc nous avons une bonne reproductibilité.

V.4. ESSAI DES ENDOTOXINES PAR LA METHODE LAL

Ceci est fait en complément de la validation.

➤ Préparation de la gamme de dilution.

Nous avons déjà reconstitué la *solution A* donc il suffit juste de vortexer le flacon pendant cinq minutes. Sa concentration est toujours de 20 EU/ml.

Nous avons ensuite prélevé 0,1 ml de cette *solution A* pour préparer la *solution B*. Le reste de la solution d'endotoxine peut se conserver pendant un mois entre +2 et +8°C.

La *solution A* a une concentration $C_1 = 20 \text{ EU/ml}$.

On veut obtenir une *solution B* de concentration $C_2 = 20\lambda$, λ étant la sensibilité du lysat qui est égale à 0,25 EU/ml. $C_2 = 5 \text{ EU/ml}$.

Nous avons prélevé 0,1ml de la *solution A* donc pour passer de la *solution A* à la *solution B* nous avons rajouté 0,3 ml d'eau LAL.

(le volume d'eau à ajouter est $V_2 = V_1(20/20 \lambda - 1)$)

Cette dilution servira à préparer pour chaque dosage le contrôle positif à 2λ (0,5 EU/ml) dans l'eau (LAL) et les deux tubes contrôles positifs produit ou P.P.C chargé par 2λ (0,5 EU/ml).

➤ **Préparation du vaccin.**

Le vaccin est reconstitué par 10ml d'eau physiologique.

Ensuite il sera dilué jusqu'à la DMS (calculée plus haut)

Dans les tubes de réaction, nous avons distribué selon le schéma suivant :

Tableau XI : Mode de distribution

Tubes	Eau LAL	Vaccin	Solution B
Contrôle négatif	100µl	-	-
Contrôle positif	100µl	-	10µl
Dosage 1 vaccin	-	100µl	-
Dosage 2 vaccin	-	100µl	-
Contrôle positif vaccin (PPC1)	-	100µl	10µl
Contrôle positif vaccin (PPC2)	-	100µl	10µl

➤ **Lecture des résultats :**

Nous avons soit un gel ferme au fond du tube qui signe une réaction positive ; soit un gel qui coule le long de la paroi lorsqu'on retourne le tube à 180° qui signe une réaction négative.

Tableau XII : Résultat dosage

Replicat	T(-)	T(+)	Dosage vaccin	PPC
1	-	+	-	+
2			-	+

➤ **Interprétation des résultats :**

Le contrôle négatif ne forme pas de gel, la réaction est négative.

Le contrôle positif Eau LAL donne un résultat positif c'est à dire un gel ferme tenant au fond du tube.

Les tubes dosages vaccin sont négatifs, le vaccin testé renferme moins de 0,25 EU/ml soit moins de 0,125 EU/dose.

Les contrôles positifs vaccin donnent des résultats positifs.

DISCUSSION



VI. DISCUSSION

Les endotoxines issues des bactéries à Gram négatif sont les principales responsables des effets toxiques attribués à la contamination des médicaments par des pyrogènes. Leur activité pyrogène est beaucoup plus élevée que celle de la plupart des autres substances pyrogènes [42, 43].

Il est important de rechercher les endotoxines dans toutes les préparations pour usage parentéral :

- Les préparations injectables ;
- Les préparations injectables pour perfusion ;
- Les préparations à diluer ou à reconstituer.

La détection des endotoxines est également importante dans les dispositifs médicaux, les eaux de dialyse.

Tout au long de notre étude nous avons travaillé avec le VACCIN AMARIL STABILISE de l'Institut Pasteur de Dakar.

L'OMS insiste sur l'importance d'assurer, en plus des contrôles effectués par les fabricants eux-mêmes, un contrôle de qualité supplémentaire par une autorité nationale de contrôle indépendante et compétente et ce, pour chaque lot de vaccin, qu'il soit produit localement ou importé. L'objectif est de veiller à ce que tous les pays aient accès à des vaccins de qualité fiable et que la qualité se maintienne jusqu'au moment où le vaccin est administré. Dans notre pays c'est le laboratoire national de contrôle des médicaments qui se charge du contrôle qualité du VACCIN AMARIL STABILISE de l'Institut Pasteur.

Selon le SRT N°872 de l'OMS [66] 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'amœbocytes de limule(LAL).

VI.1 CHOIX DE LA METHODE

Dans notre étude nous avons utilisé un test in vitro (méthode LAL).

BLECHOVA et PIVODOVA ont fait une étude comparative de la méthode LAL et du test pyrogène chez le lapin [5].

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 en 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) [7].

- Evaluation du test LAL

D'après ces mêmes auteurs la méthode LAL ses avantages certains et quelques inconvénients [5] :

Les avantages :

- ✓ On 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 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 :

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

Après cette étude comparative BLECHOVA et PIVODOVA [5] ont conclu 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.

Notre choix pour un test in vitro est ainsi justifié.

D'après la Pharmacopée Européenne [42, 43] l'essai des endotoxines bactériennes peut être réalisé par trois techniques : gélification (induction de la formation d'un gel), turbidimétrie (développement d'une turbidité par clivage d'un substrat endogène), colorimétrie (développement d'une coloration par clivage d'un complexe peptido-chromogène synthétique).

Six méthodes sont décrites :

Méthode A-Gélification : essai limite ;

Méthode B-Gélification : essai semi-quantitatif ;

Méthode C-Turbidimétrie cinétique ;

Méthode D-Colorimétrie cinétique ;

Méthode E-Colorimétrie en point final ;

Méthode F-Turbidimétrie en point final.

Parmi les six méthodes du test LAL notre choix s'est porté sur la méthode de gélification A-essai limite qui a statut de méthode de référence [43].

Les méthodes quantitatives (C, D, E, F) ont comme inconvénient de nécessiter davantage d'instrumentation, mais sont plus faciles à automatiser pour le contrôle de routine de grands nombres d'échantillons d'un même produit. Elles permettent de déterminer la teneur en endotoxines de l'échantillon examiné mais, pour la conformité à la pharmacopée et les contrôles de routines, la question finale est de savoir si cette teneur dépasse ou non une limite définie [42].

Les auteurs JOINER, KRAUS et KUPIEC écrivent que la méthode par gélification est la plus précise et la plus sensible des procédures de recherche d'endotoxines dans les préparations injectables parce qu'on obtient dans les résultats moins de faux-négatif et faux-positif [25].

D'après la Pharmacopée l'avantage de cette méthode est sa simplicité, la décision de déclarer le résultat de l'essai positif ou négatif reposant sur la présence ou l'absence de gélification, visible à l'œil nu.

En allant dans le même sens que tous ces auteurs nous nous sommes proposés de valider l'essai des endotoxines bactériennes pour le VACCIN AMARIL STABILISE par la méthode par gélification.

VI.2. ANALYSE DES RESULTATS

VI.2.1. Test de conformité

Pour notre présente étude la qualification initiale est valide. Notre sensibilité expérimentale (λ_{exp}) est bien encadrée [22] :

$$\lambda_{exp} = 0,29 \text{ EU/ml}$$

La sensibilité du fabricant est $\lambda = 0,25 \text{ EU/ml}$

$$\lambda/2 \leq \lambda_{exp.} \leq 2\lambda$$

$$0,125 \text{ EU/ml} \leq 0,29 \text{ EU/ml} \leq 0,5 \text{ EU/ml}$$

D'après la Pharmacopée la qualification initiale est en théorie très facile, mais en pratique elle nécessite une grande technicité [42] :

- Il faut manipuler les tubes délicatement ;
- Il ne doit pas y avoir de déplacement au-dessus des tubes ;
- Il faut bien agiter les solutions d'endotoxines ;
- Il faut s'appliquer pour le prélèvement et la distribution du lysat (respecter les intervalles de distribution) ;
- Retourner délicatement les tubes pour la lecture (respecter les intervalles pour la lecture).

VI.2.2. Essai de recherche des interférences

L'objectif de cette recherche d'interférences est de déterminer la concentration du produit 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 à la haute sensibilité du lysat (0,25 EU/ml) [22].

D'après GREFF-MIRGUET [17] les nombreuses causes d'interférences sont :

- La température ;
- Les conditions de pH ;
- Adsorption des endotoxines sur le matériel du laboratoire ;
- La présence de certains cations ;
- La modification de l'enzyme ou de la protéine coagulase ;
- L'activation du LAL ;
- Les conséquences de la stérilisation [16, 31].

La façon la plus courante de lever ces interférences (inhibitions et activations) est la dilution dans l'eau. Mais il existe d'autres moyens courants : [42, 43]

- Les dilutions en tampon pH 7 ou ajustement de pH ;
- Les ajouts de cations divalents : sels de Mg ou Ca ;
- Le chauffage à 60°C pendant dix minutes pour certains dérivés protéinés ;
- L'ultrafiltration.

Nous pouvons vraiment dire que le vaccin n'interfère pas dans la réaction LAL – endotoxine. Il est ni activateur ni inhibiteur. Il peut être donc dosé en routine à la dilution utilisée dans le test.

Les normes de la Pharmacopée sont :

$$\lambda_e / 2 \leq \lambda_v \leq 2\lambda_e$$

λ_v : sensibilité expérimentale du lysat dans le vaccin

λ_e : sensibilité expérimentale du lysat dans l'eau LAL

L'essai d'inhibition/activation sur un lot, puis sur trois lots de vaccin nous a confirmé l'absence d'interférences du vaccin sur le test.

Tableau XIII : Tableau récapitulatif des sensibilités.

	Eau	Vaccin/N°lot		
		Lot 1846	Lot 1847	Lot 1850
Sensibilité λ (EU/ml)	0,25	0,29	0,35	0,21

$$\lambda_e / 2 \leq \lambda_v \leq 2\lambda_e$$

$$0,125 \text{ EU/ml} \leq 0,29 \text{ EU/ml} \leq 0,5 \text{ EU/ml}$$

$$0,125 \text{ EU/ml} \leq 0,35 \text{ EU/ml} \leq 0,5 \text{ EU/ml}$$

$$0,125 \text{ EU/ml} \leq 0,21 \text{ EU/ml} \leq 0,5 \text{ EU/ml}$$

Le vaccin est sans interférence sur le test.

VI.2.3. Essai de routine

Selon les normes de la pharmacopée [42] l'essai LAL est valide si :

- Le témoin négatif ne présente pas de gélification
- Le contrôle positif eau LAL présente une gélification (un gel ferme tenant au fond du tube).
- Les tubes dosages vaccin sont négatifs, le vaccin testé renferme moins de 0,25 EU/ml.
- Les contrôles positifs vaccin donnent des résultats positifs

Notre essai satisfait à toutes ces exigences

VI.2.4. Validation de la méthode [15, 45]

La commission d'harmonisation ICH (International Conference on Harmonisation) donnent des lignes directrices pour la validation des méthodes biologiques [45].

Pour ce dosage qui est un essai limite on a eu à évaluer les critères suivant :

➤ La limite de détection

Selon les spécifications de l'Institut Pasteur [22] la valeur en endotoxines doit être inférieure à 5 UI/dose.

➤ La spécificité

La détection des endotoxines produites par les bactéries Gram négatives, se fait au moyen d'un lysat d'amœbocytes de limule. La méthode par gélification de l'essai de recherche des endotoxines bactériennes est, de fait, spécifique.

➤ **La répétabilité et la reproductibilité [45]**

Les essais ont été effectués en duplicat (deux fois) pour la gamme dans l'eau et en quadruplicat (quatre fois) pour la gamme dans le vaccin. [22]

L'écart type pour la gamme dans l'eau, $S_e = 0,21$.

L'écart type pour la gamme dans le vaccin, $S_v = 0,15$.

Cette estimation correspond à la répétabilité de la méthode. Ces écarts types sont faibles.

La variance des n_j répétitions est $S_j^2 = 0,005$

L'écart type est $S_j = 0,07$

Cette variance est faible, de même que l'écart type. Cette estimation correspond à la reproductibilité de la méthode.

En conclusion nous pouvons dire que la méthode par gélification est fiable et valide parce qu'il a été prouvé qu'elle est spécifique, répétable et reproductible.

CONCLUSION



Eléments constitutifs de la membrane externe de toutes les bactéries à Gram négatif, les endotoxines sont composées de lipides et de glucides. Libérées par la destruction des bactéries lors d'une infection, elles diffusent dans la circulation sanguine.

Elles sont dangereuses parce qu'elles provoquent des symptômes variés, qui vont de la fièvre accompagnée de frissons jusqu'au choc toxique, une insuffisance circulatoire qui tue en dérégulant les principaux organes.

Il est important de les détecter dans les préparations pour usage parentéral et les dispositifs médicaux.

Ce travail réalisé au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments de Dakar (LNCM) a été entrepris dans le but de valider le contrôle des endotoxines bactériennes sur des lots du VACCIN AMARIL STABILISE de l'Institut Pasteur de Dakar. Cet essai utilise un Lysat d'Amoebocytes de *Limule* (LAL).

Nous avons effectué le test LAL par la méthode de gélification qui était plus sensible, d'exécution facile et de moindre coût. 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 a nécessité :

- une qualification initiale qui nous a permis de vérifier la sensibilité λ du lysat déclarée et de qualifier le laboratoire pour la réalisation de l'essai des endotoxines bactériennes ;
- un essai recherche des interférences sur un lot de vaccin, puis sur trois lots de vaccin.

Nous avons confirmé la sensibilité déclarée du lysat en montrant que la sensibilité expérimentale était comprise dans l'intervalle $[\lambda/2 - 2\lambda]$.

On a ensuite démontré qu'il n'y avait pas d'interférences entre le vaccin et la réaction LAL – endotoxine, les sensibilités expérimentales des vaccins étant comprises dans l'intervalle $[\lambda/2 - 2\lambda]$.

Les valeurs des critères de validation mettent en évidence la spécificité, la répétabilité et la reproductibilité de la méthode.

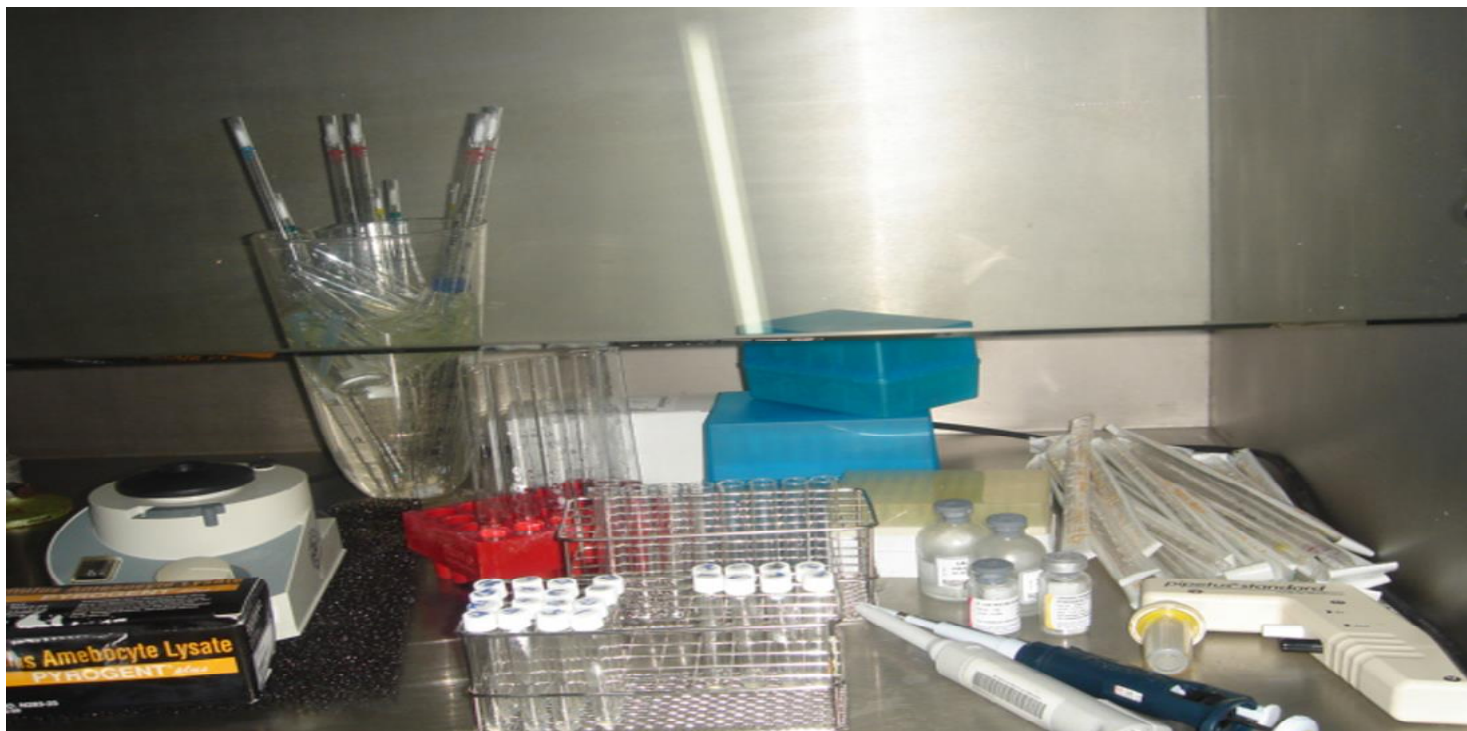
En complément de la validation nous avons procédé à un essai de routine et il a été démontré que :

- Les témoins négatifs sont non gélifiés ;
- Les contrôles positifs vaccin à 2λ (PPC) sont gélifiés ;
- Les tubes dosage vaccin sont non gélifiés.

A l'issue de la présente étude, nous pouvons dire que la méthode par gélification est valide.

L'essai des endotoxines bactériennes est une étape importante dans le contrôle qualité des vaccins. En la menant à bien les risques de choc endotoxinique sont réduits.

Par ailleurs il serait intéressant dans le futur de rechercher des pyrogènes non endotoxiniques dans les produits biologiques.



BIBLIOGRAPHIE



[1] AUSTIN E.A., GRAVES J.F. et al.

Genetic analysis of lipopolysaccharide core biosynthesis by Escherichia coli K12 insertion mutagenesis of the rfa locus.

J. BACT., 1990, **172** (9), p : 25.

[2] BELANGER M., DUBREUIL D. et al.

Role of lipopolysaccharide in adherence of Actinobacillus pleuropneumoniae to porcine tracheal rings.

Infect. Imm., 1990, **58** (11), p : 30-51.

[3] BELON-FONTAINE M.N., BRIANDET R., HERRY J.M., et MEYLHEUC.

Mécanisme impliqués dans la biocontamination des surfaces-aspect physico-chimiques-

INRA, 2004, p : 2-14.

[4] BINGEN EDOUARD.

Mécanisme d'action des bêta-lactaminesq in : Mécanisme d'action des bêta-lactamines; de la structure bactérienne à la structure de la molécule.

Nice, Laboratoire Roussel, 1986, p : 8 - 17.

[5] BLECHOVA R., PIVODOVA D.

Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) test - An alternative method for detection of bacterial endotoxines.

Acta vet. BRNO 2001, **70**, p: 291 – 296.

[6] BLEVES.S.

Défenses non spécifique. Intéraction bactéries pathogènes-hôte.

Janvier 2005, p : 4.

[7] BURCH, RUSSEL, W.M.S.

Human experimental technique.

London, 1992, p: 238.

[8] BURROWS WILLIAM.

Microbial Variations and Genetics, in: Text book of microbiology.

The biology of microorganisms 19th ed.

W. B. Saunders Compagny, philadelphia, 1969, p: 221.

[9] CISSE S.

Hétérogénéité et rôle dans l'antibiorésistance des endotoxines de souches de bacilles à Gram négatif.

Thèse Pharm, Dakar, 1994, n°76.

[10] COLTON R.C., RUSSEL J.N.

Struture de la bactérie.

Science, Mars 2003, p : 4, 39, 44, 45.

[11] COOPER J.F.

Resolving LAL test interferences.

Journal of parenteral science and technology.

1990, 44, p: 13-15.

[12] COPE L. D, YOGY R. et al.

Molecular cloning of a gene involved in lipopolysaccharide biosynthesis and virulence expression by haemophilus influenzae type b.

Molecular Microbiology, 1991, 5(5), p : 11 - 24.

[13] DIATTA H.W.

Validation des méthodes de contrôle microbiologique de différents médicaments antifongiques.

Thèse Pharm., Dakar, 2003, n°8.

[14] EUZEBY J.P.

Lipopolysaccharides (antigènes O et endotoxines).

Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.

Janvier 2004, p : 1-5.

[15] FEINBERG M.

La validation des méthodes d'analyse. Une approche chimiométrique de l'assurance qualité au laboratoire.

Masson, 1996, p : 108-123.

[16] FRIBERGER P.

A new method of endotoxin determination.

American clin. Products Rev., 1987, 13, p : 12-17.

[17] GREFF-MIRGUET.G.

Echantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air. Cahier de notes documentaires- hygiène et sécurité du travail- N°187.

INRS, 2002, p : 73-83.

[18] HAMMOND S. M.

Inhibitors of lipopolysaccharides biosynthesis impair.

The virulence potential of Escherichia coli.

F. E. M. S. Microbiology letters, Dec 1992, 79 (1-3), p : 7-29

[19] HITCHCOCK P. J., BROWN T. M.

Morphological heterogeneity among Salmonella lipopolysaccharides chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels.

J. Bact., Apr. 1983, 154(1), p : 26-79.

[20] HOPF U. et al.

In : Reeves Peter. Role of antigen variation in the immune response. Trends in Microbiology.

Oct 1995, 3(10), p : 6-38.

[21] INSTITUT PASTEUR.

Résumé du processus de fabrication du VACCIN AMARIL STABILISE de l'Institut Pasteur de Dakar.

Informations sur le produit « VACCIN AMARIL STABILISE » fabriqué par l'Institut Pasteur de Dakar au Sénégal et fourni aux agences des Nation Unies.

Dakar, 2001, p : 1-57.

[22] INSTITUT PASTEUR.

Procédure de validation du test des endotoxines.

Unité du vaccin Fièvre Jaune. Sept.2002, version 1, p : 1-5.

[23] JANN B., RESKE K. et al.

Heterogeneity of lipopolysaccharides: analysis of polysaccharide chain lengths by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

Eur. J. Biochem., 1975, 60, p : 23-46.

[24] JOHNSON A., GAINES S. et al.

Studies on the O antigen of Salmonella typhosa V. Enhancement of antibody response to protein antigens. By purified lipopolysaccharides.

Flammarion, Médecine - Sciences, Paris, 1989, p : 88 -178.

[25] JOINER T., KRAUS P., KUPIEC

Comparison of endotoxin testing methods for pharmaceutical products.

International journal of pharmaceutical compounding, Dec 2002, p: 408-409.

[26] JONES D. M., BORROW R., et al.

The lipopolysaccharides immunotype as a virulence determinant in Neisseria meningitidis.

Microbial pathogenesis, Sept. 1992, 13(3), p : 19-24.

[27] KACA W. R., LEBRECHT J., et al.

Effects of polymyxins on the lipopolysaccharides-defective mutants of proteus mirabilis.

Microbios, 1990, 61(246), p : 23-32.

[28] KADIS S., WEINENBAUM G. et al.

Microbial toxins, (5), bacterial endotoxins.

Academic press, New york 1971, 507 pages in: LEMINOR L., VERON N.,

bactério. méd., 2è éd., Flammarion, Médecine-Sciences, Paris, 1989, p : 78-88.

[29] KIM B., WATSON D. W.

Role of antibodies in reactions to gram negative bacterial endotoxins.

Ann. N. Y. Acad. Sci, 1966, 133, p : 27-45.

[30] LANVIN G.

Essai des endotoxines bactériennes. DESS Contrôle Qualité des produits de Santé – ULP Strasbourg.

Aventis pharma, France, 2002, p : 1-47.

[31] LEVIN J.

The limulus amoebocyte lysate test perspectives and problems.

Detection of bacterial endotoxines with the limulus amoebocytes lysate test.

New York, Alan R Liss, 1987, p: 1-23.

[32] LUDERITZ O., STAUB A. M. et al.

Immunochemistry of O and R antigens of Salmonella and related enterobacteriaceae.

Bacteriol. rev., 1966, 30, p : 192.

[33] MERINO S., CAMPRUBI S., et al.

The role of lipopolysaccharides in complement.

Killing Aeromonas hydrophila strains of serotype O: 34.

J. of General microbiol., Jul. 1991, 37(77), p : 83-90.

[34] MORRISON D. C., DINAREL C. A. et al.

Current status of endotoxin.

ASM News, 1995, 60(9), p: 79-86.

[35] MOUTON Y., DEBOSCKER Y. et al.

La résistance des bactéries aux antibiotiques, in : Antibiotiques-Antibiothérapie., 2è éd.,

Bristol - Myers Squibb, Paris, 1991, p: 43.

[36] MULLER., BERGHAUS G.

The role of platelets, leukocytes and complement in the activation of intravascular coagulation by endotoxin, in: De Gaetano G., and Garattini S., platelet, a multidisciplinary approach.

Raven press, New York, 1978, p: 20-30

[37] NIKAIDO H., VAARA M.

Outer membranes, in : Neidhardt F. c., and coll, Escherichia coli and Salmonella typhimurium, cellular and molecular biology, 187, ASM.

Washington D. C., p : 7-22.

[38] NIKOLAEVA A., NASTICHKIN I. A. et al.

Changes in antigenic properties of lipopolysaccharides of Shigella sonnei phase Molekuliarnaia Genetika, Mikrobiologia, i virusologia, Aug 1990, 8, p : 15-18.

[39] NIKOLAEVA A., NASTICHKIN I. A. et al.

Lipopolysaccharides changes in smooth-type avirulent Shigella in comparison with initial virulent strains

Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i immunologii, Feb 1992, 2, p : 15-18.

[40] OMS.

Fièvre Jaune. Vaccins et produits biologiques. Maladies transmissibles surveillance et actions.

Série de rapports technique, 1999, p : 1-24.

[41] PELTRE G.

Les trois grands principes de l'électrophorèse.

Cours de Virologie médicale.

Institut Pasteur, 1990.

[42] PHARMACOPEE EUROPEENNE.

Essai des endotoxines bactériennes.

3^e Edition, Addendum 1999, p : 43-51.

[43] PHARMACOPEE EUROPEENNE.

Essai des endotoxines bactériennes.

3^e Edition, Addendum 2001, p : 24-38.

[44] PREVOST C.

Le limule : ce vieil aristocrate donneur de sang.

Sea-River ; 2002, p :1, 2.

**[45] 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.

[46] REEVES PETER.

Role of O antigen variation in the immune response. Trends in Microbiology.

Oct. 1995, 3(10), p: 81-86.

[47] RIOUX-DARRIEULAT F., PARANT N. et CHEDID L.

Prevention of endotoxin induced by treatment of mouse antisera.

J. clin. Microbiol., 1976, 3, p: 21-25.

[48] SANSONETTI. P. J., KPECKO D. J., et al.

Shigella sonnei plasmids: evidence that a large plasmid is necessary for virulence.

Infect. Imm., 1989, **37**(75) in : Jolik W. K., Willett H. R. et al.

Zinsser Microbiology 18th ed., Acc / Norwalk, Connecticut, 1984.

[49] SCHAECHTER, MEDOFF, EISENSTEIN.

Microbiologie et pathologie infectieuse.

De Boeck-université, 1999, p : 171-175.

[50] SEIGEL S.E.

Use of the limulus amoebocyte lysate assay (LAL) for the detection and the quantification of the endotoxin.

Perspectives in toxicology. New York, 1977, p: 61-87.

[51] SOW A.M.

Electrophorétypes des lipopolysaccharides de souches de bacilles à Gram négatif. Interet de l'étude de la virulence et de la résitance aux antibiotiques

Thèse Pharm., Dakar, 1996, n°33.

[52] STEINDLER K.A., TSUJI K.

Potentiating effect of calcium gluconate on limulus amoebocytes lysate (LAL) gelation end point assay for endotoxin.

Journal of parenteral science and technology, 1981, **35**, p: 242-247.

[53] SUKUPOLVI S., VAARA M.

Salmonella typhimurium and Escherichia coli mutants with increased outer membrane permeability to hydrophobic compounds.

Biochem. Biophys., Acta, 1989, p : 77-87.

[54] THYSSEN M.

Colonisation des supports par les microorganismes.
DEA « Biosciences de l'environnement, chimie santé »
Ecologie bactérienne marine, 2003, p : 4-7.

[55] TRAORE H.

Droites de régression et validation du dosage microbiologique de médicaments antibiotiques et antifongiques.
Thèse Pharm., Dakar, 2004, n°58.

[56] VAARA M.

Antimicrobial susceptibility of Salmonella typhimurium carrying the outer membrane permeability mutation SS-B.
Anti microb. Agents chemother., 1990, 34, p : 53-57.

[57] VAN PUTTEN J. P.

Phase variation of lipopolysaccharide directs interconversion of invasive and immuno-resistant phenotypes of Neisseria gonorrhoeae.
EMBO Journal, Nov. 1993, 12(11), p : 40, 43, 51.

[58] VELOSKI C.

A new designation of sterile alcohols for cleanroom disinfection. Equivalent WFI bacterial endotoxin limits are assured through documented USP End-product testing.
Decon Laboratories, Inc, May 2002, p: 1-2.

[59] VERHEUL A. F., SNIPPE H. et al.

Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component.

Microbial reviews, Mars 1993, 57(1), p : 34-49.

[60] VOLK W. A., BENJAMIN D. C. et al.

Essentials of medical microbiology, 3rd ed., J. B. Lippincott company, Philadelphia, 1986.

[61] VUORIO R., VAARA M.

The lipid A biosynthesis mutation LpX A2 of Escherichia coli results in drastic antibiosupersusceptibility.

Antimicrobial agents and chemotherapy, 1992, 36(4), p : 8, 9.

[62] WANDERSMAN C., and LETOFFE S.

Involvement of lipopolysaccharides in the secretion of Escherichia coli alpha haemolysin and Erwinia chrisantemi proteases.

Molecular microbiology, Jan 1993, p : 41-50.

[63] WEISS P.J.

Pyrogen testing.

Journal Parenteral drug association, 1978, 32, p : 36-41.

[64] WESTPHAL O. et al.

Bacterial endotoxins.

Inst. Arch. Allergy, 1975, 40, p : 1-43.

[65] WHEAT ROBERT W.

Bacterial morphology and ultrastructure, in : Jolik W. K., Willett H. R. et al., Zinsser microbiology, 18th ed., Acc / Norwalk, Connecticut, 1984, p : 19, 23, 33.

[66] WHO.

Yellow Fever Vaccine.

Procurement of vaccine for public sector programmes.

Technical report series, 1999, N°872, p: 532