



Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNEE 2022

Thèse n°

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 8 avril 2013)

présentée et soutenue publiquement

le jeudi 01 décembre 2022 à POITIERS

par Madame GAYE Rokheya

née le 23 mars 1991

Les endotoxines bactériennes dans les préparations injectables: méthodes de
détection et impact potentiel chez le patient

Composition du jury :

Président : Madame HUSSAIN Didja, Maître de conférences (HDR)

Membres : Monsieur OLIVIER Jean Christophe, Professeur des universités

Monsieur ROUGER Julien, Pharmacien

Directeur de thèse : Monsieur BODET Charles, Professeur des universités



Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNEE 2022

Thèse n°

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 8 avril 2013)

présentée et soutenue publiquement

le jeudi 01 décembre 2022 à POITIERS

par Madame GAYE Rokheya

née le 23 mars 1991

Les endotoxines bactériennes dans les préparations injectables: méthodes de
détection et impact potentiel chez le patient

Composition du jury :

Président : Madame HUSSAIN Didja, Maître de conférences (HDR)

Membres : Monsieur OLIVIER Jean Christophe, Professeur des universités

Monsieur ROUGER Julien, Pharmacien

Directeur de thèse : Monsieur BODET Charles, Professeur des universités

LISTE DES ENSEIGNANTS

Année universitaire 2022 – 2023

SECTION PHARMACIE

Professeurs des universités-praticiens hospitaliers

- COUET William, pharmacie clinique
- DUPUIS Antoine, pharmacie clinique – **Assesseur pédagogique pharmacie**
- FOUCHER Yohann, santé publique, biostatistiques et épidémiologie
- MARCHAND Sandrine, pharmacologie, pharmacocinétique
- RAGOT Stéphanie, santé publique

Professeurs des universités

- BODET Charles, microbiologie
- CARATO Pascal, chimie thérapeutique
- FAUCONNEAU Bernard, toxicologie
- GUILLARD Jérôme, pharmacochimie
- IMBERT Christine, parasitologie et mycologie médicale
- OLIVIER Jean-Christophe, pharmacie galénique, biopharmacie et pharmacie industrielle
- PAGE Guyène, biologie cellulaire, biotechnologies
- RABOUAN Sylvie, chimie physique, chimie analytique
- SARROUILHE Denis, physiologie humaine – **Directeur de la section pharmacie**

Maîtres de conférences des universités-praticiens hospitaliers

- BARRA Anne, immuno-hématologie
- BINSON Guillaume, pharmacie clinique
- THEVENOT Sarah, hygiène, hydrologie et environnement

Maîtres de conférences

- BARRIER Laurence, biochimie générale et clinique
- BON Delphine, biophysique
- BRILLAUD Julien, pharmacocinétique, biopharmacie
- BUYCK Julien, microbiologie
- CHAUZY Alexia, pharmacologie fondamentale et thérapeutique
- DEBORDE-DELAGE Marie, chimie analytique
- DELAGE Jacques, biomathématiques, biophysique
- FAVOT-LAFORGE Laure, biologie cellulaire et moléculaire (HDR)
- GIRARDOT Marion, biologie végétale et pharmacognosie
- GREGOIRE Nicolas, pharmacologie et pharmacométrie (HDR)
- HUSSAIN Didja, pharmacie galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile, pharmacochimie
- PAIN Stéphanie, toxicologie (HDR)
- PINET Caroline, physiologie, anatomie humaine
- RIOUX-BILAN Agnès, biochimie – **Référente CNAES – Responsable du dispositif COME'in**
- TEWES Frédéric, chimie et pharmacotechnie
- THOREAU Vincent, biologie cellulaire et moléculaire
- WAHL Anne, phytothérapie, herborisation, aromathérapie

Maîtres de conférences associés - officine

- DELOFFRE Clément, pharmacien
- ELIOT Guillaume, pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwine, pharmacien

ENSEIGNEMENT DE L'ANGLAIS

- DEBAIL Didier, professeur certifié

Remerciements

Au Professeur Charles BODET, mon directeur de thèse, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'encadrer ma thèse et de m'avoir accompagnée tout au long de ce travail. Je vous remercie pour vos conseils, votre disponibilité et votre patience. Je vous suis profondément reconnaissante de m'avoir encadrée pour ce travail.

À Madame Didja HUSSAIN, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse et de juger mon travail. Je tiens particulièrement à vous exprimer ma reconnaissance pour votre disponibilité, votre gentillesse et votre implication dans l'organisation de ma soutenance.

À Monsieur Christophe Jean OLIVIER, je vous remercie d'avoir accepté d'être membre de mon jury et de juger mon travail. Je tiens à vous exprimer ma reconnaissance pour vos enseignements et vos encouragements.

À Monsieur Julien ROUGER, je vous remercie d'avoir accepté d'être membre de mon jury et de juger mon travail. Veuillez trouver l'expression de mon profond respect et de ma reconnaissance.

À Madame Sylvie GASTON, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'assister à ma soutenance. Je vous remercie de m'avoir accompagnée dans l'apprentissage du métier de pharmacien et transmise avec générosité vos connaissances. Je vous remercie particulièrement pour votre gentillesse et votre bienveillance. Je vous suis sincèrement reconnaissante.

À mes parents, je vous suis profondément reconnaissante pour tout ce que vous m'apportez dans ma vie. Je vous remercie pour votre soutien et vos encouragements tout au long de mes études. Je vous remercie pour l'amour que vous nous témoignez, pour l'éducation et les valeurs que vous nous avez inculqué. Aucun mot n'est assez fort pour vous exprimer ma gratitude et mon amour envers vous. Je prie Dieu qu'il vous garde longtemps avec nous. Je vous aime d'un amour incommensurable.

À mon mari, Mamadou Bamba, je te remercie pour ton soutien, tes conseils et ta bienveillance. Je te remercie particulièrement pour tes encouragements tout au long de ce travail. Je te suis profondément reconnaissante pour tout ce que tu m'apportes dans ma vie. Je suis reconnaissante de t'avoir dans ma vie et de fonder notre famille. Je prie Dieu que notre bonheur soit éternel. Je dédie cette thèse à nos enfants. Je vous aime.

À mon frère Abdoulaye, je te remercie pour ton soutien, tes conseils et ta bienveillance envers moi. Grâce à toi, la vie loin de notre famille a été moins difficile, tu as su combler ce vide. Je te suis profondément reconnaissante pour tout ce que tu m'apportes. Plus qu'un frère, tu es un ami et un confident. **À ta femme Aicha**, qui a compris ce qui nous lie et l'a consolidé. Je te remercie pour tes conseils, pour ton soutien et tes encouragements. Je vous aime.

À mes sœurs, Ndeye Sarr, Maye, kiné, Bintou et Fadaro, je vous remercie pour votre soutien et vos conseils. Vous avez toujours su me remonter le moral dans les moments de solitude. Je vous suis particulièrement reconnaissante pour votre bienveillance et l'amour que vous me témoignez. Je vous aime.

À mon frère Moustapha Mbaye, je te remercie pour ton soutien et tes encouragements. Je te suis sincèrement reconnaissante.

À toute ma famille, oncles, tantes, cousins (es), je vous remercie pour votre bienveillance.

Au dahira TAZAWOUDOU ZIHAR de Poitiers, à Serigne Momar GAYE, Serigne Cheikh DOUCOURE, Sokhna Diarra LO, Awa DIOUF et à tous les membres du dahira. Je vous remercie d'être mon socle spirituel, et de m'avoir aidée pour améliorer ma pratique religieuse.

À Serigne Ousmane et Sokhna Dioba, rencontrés au dahira vous êtes plus que des amis. Je vous remercie pour votre soutien, vos conseils et vos encouragements. Je vous suis sincèrement reconnaissante.

À mes amis, Kassidi, Karima, Roxane, Songsil, Maryse, Clémentine, Devillier, je vous remercie d'avoir partagé les bancs de la fac avec moi. Je vous remercie pour votre soutien, nos échanges culinaires et surtout nos soirées d'anniversaire. Vous êtes ma seconde famille.

À notre guide spirituel, Serigne CHEIKH SALIOU MBACKE, je vous remercie pour la personne juste que vous êtes et de nous montrer l'exemple de droiture. *Yalla bour niogui niane serigne Cheikh weer té yagui fii.*

« Consacre-toi à la recherche du savoir sans jamais te lasser : certes le pire défaut d'un chercheur, c'est de se lasser de chercher.

N'as-tu pas vu l'exemple de la corde qui à force de se frotter fréquemment à la dure margelle du puits, finit par y laisser sa trace.»

Cheikh AHMADOU BAMBA Khadimou RASSOUL

Alshamdoulilah

Table des matières

I.	Introduction	13
II.	Préparations injectables	14
II.1	Production	14
II.1.1	Les locaux	14
II.1.2	Le personnel	21
II.1.3	Stérilisation.....	25
II.1.4	La dépyrogénéation.....	27
II.2	Les contrôles sur le produit fini.....	29
II.2.1	Mirage	29
II.2.2	Test de stérilité.....	30
III.	Endotoxines bactériennes.....	35
III.1	Historique/ Endotoxine	35
III.2	Définition :.....	36
III.3	Toxicité des endotoxines :.....	38
IV.	Méthodes de recherche des endotoxines	39
IV.1	Test pyrogène de lapin	39
IV.2	Essai des endotoxines bactériennes (EEB) : LAL	40
-	Limule : présentation.....	40
-	Obtention du lysat d'amoebocytes	41
IV.2.1	Technique GEL (Méthode A et B).....	44
IV.2.2	Essais quantitatifs (Méthode C, E, F et D)	52
IV.2.3	Technique turbidité (Méthodes C et F)	55
IV.2.4	Technique Calorimétrique/ Chromogénique	56
IV.2.5	Réalisation de l'essai pour les méthodes C, D, E et F.....	57
V.	Nouveaux tests.....	58
V.1.1	Le facteur C recombinant	58
V.1.2	Contrôles préliminaires pour l'essai d'endotoxine par le FC recombinant	59
V.1.3	Réalisation de l'essai	61
V.2	Essai d'activation des monocytes (MAT).....	61
V.2.1	Qualification des sources de cellules monocytaires	62
V.2.2	Les contrôles préliminaires	63
V.2.3	Méthodes	65
V.3	Avantages et inconvénients des essai endotoxines.....	73

VI. Le risque chez le patient	74
VI.1 Physiopathologie	74
VI.2 Prise en charge de L'endotoxémie (Septicémie).....	78
VI.3 L'évaluation de l'endotoxémie (septicémie).....	79
VI.4 Le traitement antimicrobien	80
VI.5 La réanimation fluide	81
VI.6 Rétablissement de la pression artérielle.....	82
VI.7 Traitement anti-endotoxine.....	83
VI.7.1 Les anticorps monoclonaux anti-endotoxines	83
VI.7.2 Epuration extracorporelle de l'endotoxine circulante.....	84
VII. Conclusion.....	85

Liste des abréviations

LPS : lipopolysaccharide

Pyrogène : agent entraînant une élévation de la température corporelle

ANSM : Agence Nationale de la Sécurité du Médicament

FAD : Food and Drug Administration (Agence Américaine de sécurité des médicaments et des aliments)

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

IL : Interleukine

TNF : facteur de nécrose tumorale

PGE : Prostaglandine

LAL : Lysat d'amoebocytes de limule

MAT : test d'activation des monocytes

EEB : essai des endotoxines bactérienne

FCr : Facteur C recombinant

FB : Facteur B

DMS : Dilution maximale significatif

LEC : concentration limite en endotoxines

CLC : concentration limite en contaminants

LD : limite de détection

CMSP: cellules monocytaires du sang périphérique

TLR: Toll-Like Receptor

LTA: Acide lipotéichoïque

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (Hycult Biotechnology)

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DFG : taux de filtration glomérulaire

PEEP : pression expiratoire finale positive

VLDL : lipoprotéine de très basse densité.

Hypoxémie : diminution du taux d'oxygène dans le sang

Thrombocytopénie : diminution anormale du nombre de plaquette dans le sang

LBP: les LPS-Binding Protein

CD14: Cluster of Differentiation 14

TLR4: Toll-Like Receptor 4

MD2: Myeloid Differentiation protein 2

ZAC: Zone d'Atmosphère contrôlé

Pa : Pascal (unité internationale de mesure de la pression)

Ufc : Unité formant des colonies

AMDEC : Analyse des Mode de Défaillance de leurs Effets et de leurs Criticités

CTA : Central de Traitement de l'air

NAS : Niveau d'assurance de la stérilité

Gy : Gray (unité de mesure de l'absorbance d'un rayonnement ionisant)

SIRS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique

SOFA : L'évaluation séquentielle de la défaillance multiviscérale

qSOFA : La version rapide de l'évaluation séquentielle de la défaillance multiviscérale

Liste des figures

Figure 1 : Utilisation des classes ZAC selon le niveau de risque des opérations de production	15
Figure 2 : ligne de production d'un médicament injectable avec les classes des zones ZAC..	16
Figure 3: boîte Count-tact ® Biomérieux avec applicateur (www.biomerieux.com).....	19
Figure 4: Lame gélosé ®Sanipousse (shop.sanipousse.com)	20
Figure 5: Méthode de prélèvement de surface par écouvillonnage	20
Figure 6: Vêtement de protection zone de classe D (Charlotte, cache barbe et sur-chaussure) (S BOUTTIER Université Paris Sud)	22
Figure 7: Vêtement de protection en zone de classe C (S BOUTTIER Université Paris Sud)...	23
Figure 8: Vêtements de protection en zone de classe A et B (S BOUTTIER Université Paris Sud)	24
Figure 9: Organisation de la paroi bactérienne : Gram négative vs Gram positive (Dreamstime.com)	35
Figure 10: Structure des endotoxines (2).....	37
Figure 11: Les différents types de Pyrogènes	38
Figure 12: Limule (Aquaportal)	41
Figure 13: Prélèvement <i>de</i> sang de limule (fr.quora.com)	42
Figure 14: Réaction de gélification induite par les endotoxines.....	44
Figure 15: Préparation des solutions pour vérification de la sensibilité déclaré de la méthode de gélification.....	45
Figure 16: Préparation des solutions pour la recherche d'interférence pour la méthode de gélification.....	47
Figure 17: Préparation des solutions pour l'essai gélification par la méthode A.....	49
Figure 18: Préparation des solutions pour l'essai de gélification par la méthode B	50
Figure 19: Préparation des solutions pour la recherche d'interférences des essais de turbidité/calorimétrie	53
Figure 20: Réaction de turbidité induite par l'endotoxine	55
Figure 21: Réaction calorimétrie induite par l'endotoxine.....	56
Figure 22: réaction fluorescente induite par les endotoxines en présence d'un substrat fluorogénique.....	58
Figure 23: Préparation des solutions pour la méthode A de l'essai MAT.....	67
Figure 24: Préparation des solutions pour la méthode B de l'essai MAT.....	69
Figure 25: préparation des solutions pour la méthode C de l'essai MAT.....	72
Figure 26: Cascade de réponse induite par les LPS www.researchgate.net	76

Liste des tableaux

Tableau 1 : limites recommandées de contamination particulière par les BPF (1).....	18
Tableau 2 : les limites de contamination microbiologique recommandées par les BPF (1) ..	18
Tableau 3 : nombre de récipients de l'essai de stérilité par taille du lot de médicament injectable. source : La Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) 10e Édition - Direction européenne de la qualité du médicament & soins de santé (edqm.eu)	31
Tableau 4 : Quantité minimale d'échantillon à utiliser pour chaque milieu pour l'essai de stérilité.....	31
Tableau 5 : Souches microbiologiques pour essai de fertilité des milieux de cultures et d'applicabilité de la méthode.....	32
Tableau 6 : Comparaison des méthodes d'essai d'endotoxine	74
Tableau 7 : Expression clinique du dysfonctionnement des organes dans la septicémie	75

I. Introduction

Les préparations injectables sont des produits médicaux spécifiques du fait de leur mode d'administration, ils passent directement dans le système sanguin sans subir aucune modification. Leur production respecte des processus particuliers, et le produit fini doit être aparticulaire, limpide, stérile et apyrogène. Les tests de stérilité sont importants, mais ne sont pas suffisants pour garantir une innocuité du médicament parentérale. En plus des tests de stérilités, la détection de pyrogènes est indispensable. Les pyrogènes sont des substances non détruites par les procédés de stérilisation standard, d'autres méthodes de dépyrogénéation sont utilisées pour les éliminer. Dans le sang, ils entraînent de la fièvre et peuvent induire un choc septique. Les pyrogènes peuvent être des éléments bactériens appelés endotoxine ou autres. Les endotoxines sont libérées après la lyse bactérienne et ils sont biologiquement actifs, ils provoquent des effets toxiques pouvant entraîner une endotoxémie, et même la mort. Pour éviter ce risque chez le patient, le système qualité pharmaceutique doit être en mesure de prouver de la stérilité des médicaments parentéraux, mais aussi qu'ils sont apyrogènes. Les laboratoires pharmaceutiques de production parentérale sont dans l'obligation de respecter certaines normes réglementaires (Agence nationale de la sécurité du médicament (ANSM), Food and drug administration (FDA), Bonnes pratiques de fabrication (BPF), pharmacopée européenne, etc. ...) de fabrication et de détection des endotoxines pour une mise sur le marché de leur produit. Au fil des années, plusieurs méthodes sont utilisées pour détecter les endotoxines, en passant par le test *in-vivo* chez le lapin aux tests *in-vitro*.

Dans un premier temps la production des médicaments injectables sera abordée en mettant l'accent sur les tests de stérilité et la dépyrogénéation. Ensuite, les endotoxines et leur toxicité ainsi que les méthodes de détection des endotoxines dans les médicaments injectables seront décrites. Enfin la physiopathologie d'une endotoxémie et sa prise en charge médicale seront traitées.

II. Préparations injectables

Selon la pharmacopée européenne « Les préparations injectables sont des préparations parentérales liquides stériles, généralement administrées en bolus. Ce sont des solutions, des dispersions colloïdales, des émulsions ou des suspensions contenant une ou plusieurs substances actives et éventuellement des excipients dans de l'eau, dans un liquide non aqueux approprié ou dans un mélange de ces 2 liquides ». Dans certaines conditions le liquide non aqueux peut ne pas être stériles.

Les émulsions sont homogènes, les phases ne doivent pas être distinguées et les suspensions contenant des agrégats doivent être facilement disperser par agitation pour obtenir une suspension suffisamment stable permettant d'administrer la dose voulue.

Une préparation injectable doit être:

- Stérile : absence de tout organisme vivant ou revivifiable
- Apyrogène : absence de substance pyrogène
- Aparticulaire : absence de particule inerte (cellule de peau morte, fibre, métal, verre)

Du fait de ses spécificités, la production de médicaments injectables s'effectue dans un environnement spécifique et adapté à chaque étape de la production. La maîtrise de la qualité du médicament doit être assurée tout au long de la production.

II.1 Production

Les opérations de production de médicament injectable se divisent en deux, celles qui concernent les produits stérilisés dans leur récipient final et celles concernant les produits dont certaines ou toutes étapes de fabrication se déroulent dans des conditions aseptiques. Dans les deux cas la fabrication s'effectue dans des zones à atmosphère contrôlée (ZAC) avec des niveaux de propreté correspondant au niveau requis de l'étape de production. Tout un ensemble de mesures et de normes doivent être appliquées pour assurer l'innocuité (stérile, aparticulaire et apyrogène) du médicament injectable. Ces normes sont instaurées par les autorités compétentes (ANSM, FAD.) et traduites par le fabricant en procédures et protocoles appliquées en interne. Ils s'appliquent au personnel, aux locaux et aux matières premières composant le médicament.

II.1.1 Les locaux

Les bonnes pratiques de fabrication (BPF) constituent le guide principal qui décrit les étapes et les règles de bienséances permettant d'assurer le niveau de qualité requis pour la production de médicament injectable (et tout médicament en général). Concernant les locaux selon les BPF « La fabrication des médicaments stériles doit s'effectuer dans des zones d'atmosphère contrôlée. Les zones d'atmosphère contrôlée doivent être maintenues à un niveau de propreté et alimentées en air filtré sur des filtres d'efficacité correspondant au niveau de propreté requis. »

Les zones d'atmosphère contrôlée sont des zones dont la qualité de l'air et le niveau de propreté sont contrôlés à une fréquence bien définie. Elles sont construites et utilisées de façon à minimiser l'introduction, la production, la multiplication et la persistance de contaminant (particules, microorganismes, etc.). Dans les ZAC, la température, l'humidité et la pression sont maîtrisées comme il convient.

II.1.1.1 Classification des locaux

Les ZAC sont classées selon le niveau de qualités requises pour l'environnement, on distingue quatre niveaux nommés : A, B, C et D. Le niveau de propreté et la qualité de l'air est décroissant de la classe A au classe D (figure1).



Figure 1 : Utilisation des classes ZAC selon le niveau de risque des opérations de production

- La classe A

Les opérations à hauts risques sont réalisées dans les zones de classe A. Par exemple le remplissage des flacons et ampoule, et la répartition aseptique sont réalisés dans ces zones. Un système clos de flux d'air laminaire y est utilisé pour filtrer l'air.

- La classe B

Les zones de classe B se situent à l'environnement immédiat des zones de classe A. Ils sont équipés du même système de flux d'air laminaire clos.

- Les classes C et D

Ces zones sont destinées aux étapes moins critiques de la production de médicament stérile. Elles correspondent aux sas personnel et matière première, à la zone préparatoire pour la classe C et aux zones pré-sas personnel et la laverie pour la classe B.

Dans ces zones, le flux d'air laminaire est un système clos isolateur.

Un exemple schématisé d'une ligne de production d'un médicament injectable permettant de différencier les classes de ZAC selon les étapes de la fabrication est représenté par la figure 2 suivante.

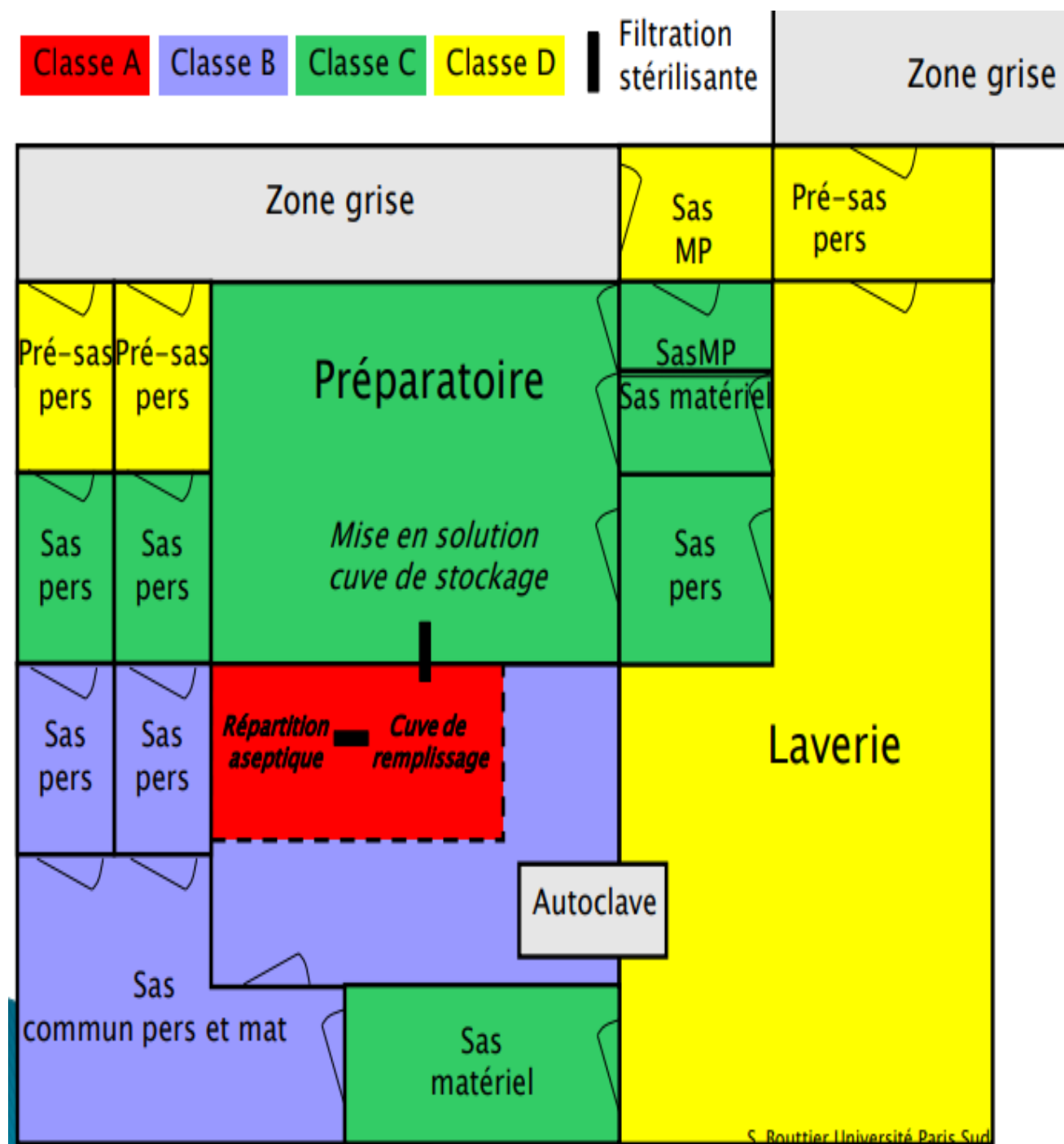


Figure 2 : ligne de production d'un médicament injectable avec les classes des zones ZAC

(Professeur S Bouttier, université Paris Sud)

II.1.1.2 Maintien des zones

Il existe une différence de pression entre les zones pour maintenir la qualité de l'air requise dans chaque zone. La pression est définie de tel sort que la pression d'une zone soit positive (plus élevée) par rapport aux zones voisines de classe inférieure. Ainsi les écarts de pression doivent être de :

- Au moins 20 Pa (Pascal) entre l'extérieur et la première zone classée
- Au moins 15 Pa entre zones classées différentes adjacentes
- Au moins 5 Pa entre 2 zones classées identiques

Du fait que l'air circule d'une zone de forte pression vers une zone de pression inférieure, cette cascade de pression empêche l'air de circuler d'une zone de classe inférieure vers une zone de classe supérieure. Par exemple il sera impossible que l'air d'une zone de classe D circule vers une zone de classe B. Ce principe permet d'éviter une contamination entre zones adjectives et de maintenir le niveau propreté et de qualité de l'air de chaque zone.

II.1.1.3 Les paramètres à surveiller dans les Zac

Certains paramètres sont contrôlés régulièrement pour s'assurer que les dispositifs mis en place pour éviter toute contamination des zones classées sont efficaces. Les contrôles s'effectuent en deux situations : à arrêt de la production et en absence de personnel d'au moins 15 minutes et en fonctionnement des installations en présence du personnel. La fréquence et les plans de prélèvement sont définis par une analyse de risque type AMDEC (Analyse des Modes de Défaillance de leurs Effets et de leurs Criticités). AMDEC est une méthode collaborative qui fait appel à l'expertise des personnes connaissant le processus à analyser pour identifier les risques, leurs fréquences d'apparition, la gravité de leurs effets et leur détectabilité afin de les éviter.

Les paramètres à surveiller sont : les particules en suspension, les microorganismes, la différence de pression, la température et l'hygrométrie.

II.1.1.3.1 Surveillance particulière

Des prélèvements d'air sont effectués au niveau des lignes de production dans toutes les zones classées au repos et en activité. Un compteur de particule avec un dispositif de prélèvement permettant d'enregistrer et de trier la taille des particules est utilisé.

Les points de prélèvement sont précisés et cartographiés par le fabricant. Le prélèvement se fait face à l'écoulement de l'air si le flux est unidirectionnel et vers le haut si le flux est non unidirectionnel.

La zone est considérée conforme si les valeurs obtenues ne dépassent pas la limite définie par les BPF renseigné dans le tableau 1 suivant.

Tableau 1 : limites recommandées de contamination particulaire par les BPF (1)

	<i>Au repos</i>		<i>En activité</i>	
<i>Classe</i>	<i>Nombre maximal autorisé de particules par m³ de taille égale ou supérieure aux tailles précisées.</i>			
	<i>0.5 µm (d)</i>	<i>5 µm</i>	<i>0.5 µm (d)</i>	<i>5 µm</i>
<i>A</i>	3520	20	3520	20
<i>B</i>	3520	29	352000	2900
<i>C</i>	352000	2900	3520000	29000
<i>D</i>	3520000	29000	<i>Non défini</i>	<i>Non défini</i>

II.1.1.3.2 Surveillance microbiologique

Les microorganismes sont contrôlés dans les zones classées, et dans chaque zone un seuil est défini selon les normes des organismes nationaux et internationaux (BPF, ANSM, FAD,). Dans le tableau 2 sont décrites les limites de contamination microbiologique recommandées dans les zones classées pour la fabrication de médicaments injectables.

Tableau 2 : les limites de contamination microbiologique recommandées par les BPF (1)

Limites recommandées de contamination microbiologique (a)				
Classe	Echantillon d'air ufc/m³	boîtes de Pétri (diam.:90 mm), ufc/4heures (b)	géloses de contact (diam. :55 mm), ufc/plaque	empreintes de gant (5 doigts) ufc/gant
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

(a) Il s'agit de valeurs moyennes

(b) Certaines boîtes de Pétri peuvent être exposée pendant moins de 4 heures

Ufc : unité formant une colonie

Diam : diamètre

Prélèvements

Contrôle microbiologique de l'air : deux méthodes sont utilisées

- a. La sédimentation : deux boîtes de Pétri sont ouvert sur la paillasse pendant 1 h pour l'une et pendant 4 heures pour l'autre. Elles sont ensuite incubées pendant 48 h à 32.2 °C (°C= degré Celsius)
- b. Collecteur d'air : un prélèvement de 100 L d'air est collecté pendant 1 h sur une boîte de Pétri et la même opération est effectuée pendant 10 min pour collecter 1000 L d'air dans une autre boîte de Pétri.

Dans les zones de classe A et B, les 2 méthodes sont utilisées pour le contrôle et en zone de classe C et D, seul le collecteur d'air est utilisé.

Contrôle microbiologique du personnel

Les équipements de protection sont adaptés à chaque zone classée et permettent d'éviter une contamination de ces zones par le personnel. En cours d'utilisation, d'éventuelles contaminations sont vérifiées régulièrement sur ces équipements. Pour le prélèvement, un opérateur muni des gants de protection pose les 5 doigts en appuyant légèrement sur une gélose qui sera mise en incubation pour culture microbiologique.

Contrôle microbiologique de l'environnement : 3 méthodes peuvent être utilisées.

- a. Prélèvement par boîte de Count-tact

La boîte Count-tact est un milieu de culture prêt à l'emploi. (figure 3)

La boîte Count-tact est déposée à l'aide d'un applicateur sur une surface (paillasse, préparatoire). Au bout de 10 s (secondes), un bip se déclenche donnant le signal pour enlever la boîte Count-tact puis elle est refermée et mise en incubation.



Figure 3: boîte Count-tact[®] Biomérieux avec applicateur (www.biomerieux.com)

b. Prélèvement par lame gélosée

La lame gélosée est un milieu de culture (Figure 4), elle est appliquée en surface en appuyant légèrement, puis elle est remise dans son flacon pour une incubation.



Figure 4: Lame gélosé[®] Sanipousse (shop.sanipousse.com)

c. Prélèvement par écouvillonnage

Sur la surface à prélever, l'écouvillon est appliqué en suivant un schéma spécifique comme indiqué dans la figure 5 puis il est plongé dans un tube à essai stérile pour déposer le prélèvement. L'opération est répétée trois fois de suite. Ensuite le prélèvement est ensemencé dans un milieu de culture.

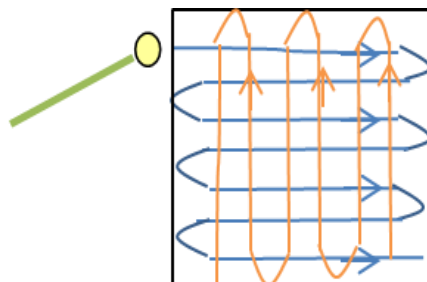


Figure 5: Méthode de prélèvement de surface par écouvillonnage

Note : Le schéma bleu est réalisé en premier puis le schéma orange en deuxième.

Tous les milieux de culture des prélèvements de surface sont incubés à 37 °C pendant 48-72h.

L'utilisation de boîte Count-tact pour le prélèvement de surface reste la méthode la plus fiable par rapport aux méthodes lame gélosée (temps de pose pouvant varier) et écouvillonnage (gestuelle de prélèvement personne-dépendant, capacité des écouvillons à relarguer la suspension bactérienne, etc.).

Résultats

Après incubation des milieux de culture, les colonies formées sont dénombrées. Les résultats sont comparés aux limites définies, si pour une zone le résultat dépasse le seuil défini des investigations doivent être menées pour définir les points à améliorer et les actions à mettre en place pour les corriger.

II.1.1.3.3 Surveillance de l'air (pression, température et humidité)

L'air est traité par un CTA (central de traitement de l'air) qui permet de limiter la quantité de particules. Le CTA permet aussi de diluer et d'éliminer les particules générées au cours de la fabrication. L'alimentation en air est munie d'un système d'alarme qui permet de détecter les défaillances.

Le débit d'air est contrôlé par un débitmètre, la température et l'humidité sont aussi contrôlées régulièrement.

Le respect des normes concernant les locaux est essentiel pour garantir le niveau de qualité requis pour la fabrication de médicaments injectables et les contrôles permet de détecter les risques de contamination potentielle et avérée et de les corriger.

II.1.2 Le personnel

Le personnel aussi constitue un risque de contamination, il doit s'adapter aux conditions de fabrication des médicaments injectables. Le personnel doit avoir une formation, porter un équipement et avoir un gestuel de travail adapté à chaque zone classée.

II.1.2.1 Formation du personnel

Le personnel doit être formé aux bonnes pratiques de fabrication des médicaments stériles, aux techniques d'habillage et au comportement en ZAC. Ces formations sont dispensées en interne lors de prise de poste ou pour renouveler une habilitation. Les formations sont validées par une épreuve écrite ou par une mise en situation. Le personnel qui valide ses formations, aura son habilitation pour son poste. Ces formations sont obligatoires et l'employeur doit s'en assurer pour la prise de poste.

II.1.2.2 Les vêtements de protection en ZAC

Selon les BPF « Les vêtements et leur qualité doivent être adaptés aux fabrications et aux classes des zones de travail. Ils doivent être portés de façon à protéger le produit des contaminations ».

Le personnel est habilité à l'habillage par une formation validée lui permettant de respecter les règles d'habillage en ZAC. Il est défini dans chaque zone classée les équipements que doit porter le personnel.

Equipements de protection en zone de classe D

Les cheveux et la barbe doivent être couverts par une charlotte et une cache barbe. L'opérateur doit porter une blouse et des sur-chaussures ou des chaussures adaptées comme sur la figure 6.



Figure 6: Vêtement de protection zone de classe D (Charlotte, cache barbe et sur-chaussure) (S BOUTTIER Université Paris Sud)

Equipements de protection en zone de classe C

En plus des équipements requis en classe D, le personnel doit porter un vêtement constitué d'une veste et d'un pantalon, d'une combinaison et d'une blouse serrée aux poignets et munie d'un col montant. Le tissu ne doit virtuellement pas libérer des particules ou fibres. Des chaussures ou des couvres chaussures adaptées doivent être portées. (figure 7)



Figure 7: Vêtement de protection en zone de classe C (S BOUTTIER Université Paris Sud)

Equipements de protection en zone de classe A et classe B

Le personnel doit porter une sous-tenue constituée d'un pantalon et d'une veste. Au-dessus de la sous-tenue, on met une combinaison comme en classe C plus un masque qui couvre le visage puis une cagoule qui renferme totalement les cheveux avec une reprise au niveau du col (figure 8). Les gants sont en caoutchouc ou en plastique et sont stérilisés et non poudrés. Le bas du pantalon est enserré dans les bottes et les manchettes dans les gants. La tenue doit être décontaminée et stérilisée et les bottes stérilisées ou désinfectées.

Les vêtements de protection doivent libérer un minimum de fibres et de particules et doivent retenir les particules émises par l'opérateur.



Figure 8: Vêtements de protection en zone de classe A et B (S BOUTTIER Université Paris Sud)

II.1.2.3 Comportement du personnel en zone classée

Le personnel doit avoir un comportement approprié pour éviter l'émission des particules. Il doit éviter les déplacements inutiles et se déplacer lentement et adopter des gestes méthodiques et précis. En position debout, les bras sont au long du corps et en position assise les mains sont posées sur le genou les paumes en haut. Il doit aussi se désinfecter régulièrement les gants (toutes les 2 à 3 minutes). Les portes sont systématiquement fermées pour maintenir les cascades de pression. Si un opérateur éternue dans une zone classée, il doit sortir du sas (si pas possible) ou se diriger vers les reprises d'air basses ou sortir dans les vestiaires pour se moucher, changer de gants, masque, la combinaison et les sur-chaussures.

Ces comportements, à adapter dans les ZAC sont coûteux (équiper tout le personnel et les changements réguliers) et constituent une contrainte de temps (changement d'équipement à chaque sortie de sas) mais constitue un moyen efficace pour éviter la contamination des ZAC par le personnel lors de la fabrication des médicaments injectables.

Même si tous les moyens sont mis en place pour éviter la contamination du produit pendant sa fabrication, le risque de contamination n'est jamais à zéro, c'est pour cela que des contrôles

sont aussi effectués sur le produit fini ainsi qu'un test de remplissage aseptique pour les produits qui ne peuvent être stérilisés dans leur récipient final.

II.1.3 Stérilisation

La stérilisation est un procédé permettant d'obtenir un produit stérile soit par élimination ou par mort de microorganismes vivants ou revivifiables. Pour un procédé de stérilisation, le niveau d'assurance de la stérilité (NAS) doit être inférieur ou égale 10^{-6} , il indique le degré avec lequel une population d'articles est rendue stérile par le procédé considéré. Le NAS est la probabilité d'avoir un article non stérile dans un lot d'article stérilisé. Il existe 3 méthodes de fabrication des produits stériles : la stérilisation terminale, la filtration stérilisante et la préparation aseptique.

II.1.3.1 La stérilisation terminale

La stérilisation terminale consiste à faire subir le traitement sur le produit fini dans son récipient final. Elle est la méthode utilisée à chaque fois que le produit et son conditionnement le permet. Il existe 4 méthodes de stérilisation terminale, la stérilisation par la vapeur (autoclave), la stérilisation par la chaleur sèche (four ou tunnel), la stérilisation par irradiation ionisante et la stérilisation par les gaz.

II.1.3.1.1 La stérilisation par la vapeur

La stérilisation par la vapeur s'effectue dans des autoclaves, qui sont des enceintes qui génèrent de la vapeur en continu avec un système d'évacuation de l'eau pour maintenir la pression et la température à des niveaux contrôlés. Les autoclaves sont qualifiés pour leur capacité à maintenir des conditions homogènes à l'intérieur de l'enceinte et de la charge. L'autoclave doit être muni de capteurs température et de pression placés à des endroits bien précis pour contrôler le cycle de stérilisation. Une sonde thermique indépendante est placée au point de charge ou dans le récipient fermé le plus lent à chauffer. La compatibilité de l'équipement avec le produit à stériliser, la disposition du chargement et la performance du cycle sont vérifiées lors de la qualification de performance de l'autoclave.

Le cycle de référence pour la stérilisation par la vapeur est de 15 min à 121°C au point le plus froid de l'autoclave. Le cycle peut être adapté au produit et au chargement après une étude de validation, mais la température minimale acceptable pour une stérilisation par la vapeur est de 110°C.

Les contrôles de routine se basent sur les enregistrements de température et de pression de chaque cycle de stérilisation.

II.1.3.1.2 la stérilisation par la chaleur sèche (four ou tunnel)

La stérilisation par la chaleur sèche se base sur un transfert de chaleur aux articles à stériliser soit par convection, par rayonnement ou par transfert direct. Elle est réalisée dans un four à ventilation forcée ou dans un tunnel. Le chargement du stérilisateur doit permettre que la température requise soit atteinte dans l'ensemble de la charge. Des sondes thermiques sont placées à l'intérieur du stérilisateur ou dans les points les plus froids pour enregistrer la température pendant le cycle de stérilisation.

Les conditions de référence pour un cycle de stérilisation par chaleur sèche sont 160°C au minimum pendant au moins 2 heures. D'autres combinaisons de temps et de température sont possibles s'il est justifié que le NAS obtenu après stérilisation est inférieur ou égal à 10^{-6} .

Les contrôles de routine se basent sur la détermination du profil de température établi au minimum sur les points les plus froids du stérilisateur.

II.1.3.1.3 Stérilisation par irradiation

La stérilisation par irradiation repose sur l'exposition des articles à stériliser à un rayonnement ionisant. Ce rayonnement peut être un rayonnement gamma provenant d'isotope approprié, un faisceau électronique énergisé au moyen d'un accélérateur d'électrons approprié, ou des rayons X produits par bombardement d'une cible appropriée avec des électrons énergisés.

La dose de référence est de 25 kGy (kilo Gray) en dose absorbée. D'autres doses peuvent être utilisées si la méthode permet de justifier un NAS inférieur ou égal à 10^{-6} après stérilisation.

Les contrôles de routine se font par un suivi de la dose délivrée au cours de la stérilisation par un système de dosimétrie et une traçabilité des mesures par rapport à des étalons nationaux.

II.1.3.1.4 Stérilisation par des gaz

La stérilisation par les gaz est utilisée pour stériliser les emballages primaires, les équipements, et certains produits pharmaceutiques. Deux types de gaz peuvent être utilisés pour la stérilisation selon leurs actions antimicrobiennes, les agents alkylants et les agents oxydants. Les agents alkylants sont hautement réactifs et interagissent avec plusieurs composés notamment au niveau des groupements amino, hydroxyle et des bases puriques. Les agents oxydants sont des composés toxiques très réactifs.

La stérilisation s'effectue par exposition du produit à l'agent gazeux dans une enceinte étanche et dans des conditions spécifiées. Une combinaison de méthodes physiques et biologiques permettant d'obtenir les conditions de stérilisation optimales est définie lors du développement du procédé. Une validation de performance microbiologique permet de vérifier l'efficacité du cycle. La létalité est déterminée en exposant les microorganismes d'essai à des cycles de durée graduée pour construire des courbes de suivis. La stérilisation ne doit pas altérer la fonctionnalité du produit et du récipient.

II.1.3.2 Filtration sur membrane

La filtration sur membrane permet de réduire la contamination microbiologique des gaz et fluides ne pouvant pas être stérilisés par la chaleur ou par irradiation. Elle repose sur l'élimination des microorganismes par un effet de tamisage et d'interaction de surface.

La stérilisation est réalisée par passage du produit à travers une membrane microporeuse dont la taille nominale des pores ne dépasse pas 0,22 µm. La contamination microbienne (biocharge) de chaque lot est déterminée avant la stérilisation et la taille du filtre doit être proportionnelle au volume du produit à filtrer et sa biocharge. Les filtres sont stérilisés avant leur utilisation et leur transfert se fait dans des conditions aseptiques pour éviter une contamination du produit.

Les contrôles de routine se basent sur des paramètres physiques et microbiologiques établis lors des essais de validation tels que : la contamination microbienne avant stérilisation, les résultats des essais d'intégrité préfiltration, la durée de filtration, le volume filtré, la pression différentielle.

II.1.3.3 La préparation aseptique

La préparation aseptique permet de garantir la stérilité d'un produit constitué de différents composants stérilisés par une des autres méthodes de stérilisation (par la chaleur, irradiation ou filtration). La préparation aseptique se fait dans des conditions appropriées et dans un environnement adapté permettant d'éviter la contamination microbienne. Elle peut être appliquée à plusieurs étapes de fabrication du produit : le remplissage et la fermeture des récipients, le mélange des composants de la formulation, le conditionnement.

Pour maintenir la stérilité des composants du produit en cours de fabrication, certains paramètres doivent être surveillés comme : l'environnement et les surfaces (la partie II.1.1 les locaux), le personnel et leur équipement de protection (dans la partie II.1.2), la stérilisation des composants et la durée de stockage du produit fini avant conditionnement. Le procédé lui-même est contrôlé par le test de remplissage aseptique (TRA) et le produit fini est soumis l'essai de stérilité (II.2.1).

II.1.4 La dépyrogénéation

La dépyrogénéation est un procédé permettant d'enlever tous les éléments susceptible d'induire une élévation de température (pyrogènes) chez un patient. Elle peut être obtenue par inactivation ou par élimination des endotoxines. Les endotoxines sont des lipopolysaccharides, ils sont les plus actifs et les plus difficiles à éliminer des pyrogènes.

La dépyrogénéation concerne les articles (emballages primaires : verrerie) destinés à être en contact direct avec le produit stérilisé final.

II.1.4.1 Traitement par la chaleur sèche

La dépyrogénéation par la chaleur sèche est la méthode la plus couramment utilisée pour la verrerie et les autres matériaux résistant à la chaleur. Elle est réalisée dans un four ou un tunnel avec une ventilation forcée. Les articles sont exposés pendant au moins 30 min à une température d'au moins 250 °C. D'autres combinaisons de température et de durée peuvent être utilisées si elles sont validées, mais la combinaison minimale requise est de 3 h à 180°C. Pour la surveillance de l'efficacité du cycle, la température est mesurée au minimum au niveau du point de l'enceinte le plus difficile à chauffer, identifié lors de la qualification.

D'autres méthodes de dépyrogénéation peuvent être utilisées que si le traitement par la chaleur sèche n'est pas possible. Ces méthodes sont le traitement physique ou traitement chimique.

Le traitement physique : la dépyrogénéation se fait par rinçage des articles avec de l'eau de qualité pharmaceutique comme l'eau pour préparation injectable (Eau PPI). Les articles sont séchés après nettoyage.

Le traitement chimique : la dépyrogénéation s'effectue par des réactifs chimiques avec des agents alkylants, oxydants ou réducteur fort capable d'éliminer les pyrogènes. Il est suivi d'un chauffage ou non et d'un rinçage terminal avec de l'eau PPI. Un contrôle pour détecter d'éventuelles traces de résidu chimique est fait après le traitement.

Toutes ces méthodes de dépyrogénéation doivent être validées avant leur mise en application.

II.1.4.2 Validation de la méthode de dépyrogénéation

La validation de la méthode s'effectue en ajoutant à la charge à stériliser des indicateurs d'endotoxines aux points identifiés comme étant plus difficiles à dépyrogéniser. Ces indicateurs sont des endotoxines bactériennes purifiées, ils sont identifiés par leur numéro de lot, le genre et l'espèce bactérienne. Leur activité spécifique doit être indiquée en unité internationale par gramme ou par récipient.

Les indicateurs d'endotoxines sont utilisés pour mesurer la réduction ou l'inactivation des endotoxines qu'assure la méthode de dépyrogénéation. Ils sont soit prêts à l'emploi et se présentent sous forme d'ampoules, de flacons ou d'autres formes pré-ensemencées avec une quantité d'endotoxines connue ou soit l'indicateur est préparé à façon et ce sont des articles qui sont ensemencés en surface avec une quantité d'endotoxine connue. Le type de support utilisé doit être représentatif de l'article à dépyrogéniser.

La méthode est validée par deux procédures d'essai : l'essai de récupération et l'essai de réduction de l'endotoxine.

L'essai de récupération de l'endotoxine est effectué sur les indicateurs d'endotoxine non soumis aux méthodes de dépyrogénéation pour calculer le pourcentage de récupération et de vérifier les interférences avant de réaliser la dépyrogénéation. Si le taux de récupération ne permet pas de démontrer une réduction de 3 log₁₀, la quantité d'endotoxine doit être ajustée.

L'essai de réduction de l'endotoxine est fait sur des articles contaminés par une quantité d'endotoxine connue et placés dans la charge à tester. Les quantités d'endotoxines sont évaluées avant et après dépyrogénéation selon la même méthode validée.

II.2 Les contrôles sur le produit fini

II.2.1 Mirage

Le mirage est une méthode de détection visuelle de la présence de particule visible dans le récipient final du médicament injectable. Le mirage peut être manuel effectué par un personnel habilité ou automatisé. La totalité du lot est contrôlée, environ 1000 unités/heure pour une inspection manuelle et 18000 unités/heure pour une inspection automatique.

II.2.1.1 Mirage manuel

Le mirage manuel est effectué par un personnel formé et habilité à l'aide d'un appareil de mirage.

L'appareillage est composé d'un poste d'observation comprenant :

- Un panneau noir mat placé en position verticale
- Un panneau blanc anti éblouissant en position verticale à côté du panneau noir
- Une rampe d'éclairage orientable comprenant une source de lumière blanche protégée et un diffuseur approprié.

Le mode opératoire

- Le récipient est agité doucement ou renversé avec précaution en évitant la formation de bulles d'air.
- Il est observé pendant 5 secondes environ contre le panneau blanc puis contre le panneau noir.
- La présence de toute particule est notée.

Habilitation du personnel

Le personnel doit justifier d'une formation et d'aptitude pour être habilité au mirage.

- Un examen de la vue est obligatoire et il doit avoir un certificat d'aptitude au poste.
- Avoir une formation lui permettant de connaître les principes d'inspection visuelle et d'apprentissage des défauts.
- Il doit être formé à l'apprentissage de la méthode sur un équipement qualifié et à détecter les particules en conditions réelles avec un kit de certification avec différents types de défauts.

L'aptitude du personnel à détecter les défauts est validée par une évaluation pratique.

II.2.1.2 Le mirage automatique

Il est effectué par un automate qualifié et validé.

II.2.2 Test de stérilité

L'essai de stérilité permet de vérifier l'absence de microorganismes viables dans les préparations et produits stériles avant leur commercialisation. Selon la pharmacopée européenne (chap 2.6.1), il s'effectue sur un échantillon représentatif du lot et dans des conditions aseptiques. L'essai peut être réalisé par la technique de filtration sur membrane ou par ensemencement direct du milieu nutritif par le produit à examiner. A chaque fois que la nature du produit le permet (préparation aqueuse filtrable, alcoolique ou huileuse, soluble dans les solvants aqueux ou huileux), la filtration sur membrane est la méthode utilisée. Seule la méthode de filtration sur membrane est décrite pour la suite.

Matériels :

Milieus de culture :

- Milieu liquide thioglycolate

Permet la recherche des bactéries aérobies et anaérobies.

La Rosazine présente dans ce milieu est oxydée en présence de l'oxygène et se colore en rose.

Incubation : 30 – 35°C

Ph : 7,1+/-0,2

- Milieu liquide à l'hydrolysate de caséine et de soja (TSA)

Permet la recherche de levures, moisissures et des bactéries aérobies

Incubation : 20 - 25°C

Ph : 7,3+/-0,2

Pompe et membrane

La filtration est faite avec pompe à vide munie d'un entonnoir sous une hotte à flux laminaire de classe A. La membrane doit être de porosité inférieure ou égale à 0,45 µm dont l'efficacité de rétention des microorganismes a été établie. Des membranes de nitrate de cellulose sont utilisées pour les solutions aqueuses, huileuses ou faiblement alcooliques et des membranes d'acétate de cellulose pour les solutions fortement alcooliques. L'emploi de membranes spéciales peut être nécessaire pour certains produits (exemple les antibiotiques). Selon le diamètre des membranes utilisées, le volume des dilutions et des solutions de rinçage doivent être adaptés.

Echantillon: le nombre de récipients à examiner dépend de la taille du lot comme indiqué dans le tableau 3 et les quantités minimales du produit à utiliser pour chaque milieu sont définies dans le tableau 4.

Tableau 3: nombre de récipients de l'essai de stérilité par taille du lot de médicament injectable.

source : *La Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) 10e Édition - Direction européenne de la qualité du médicament & soins de santé (edqm.eu)*

Nombre d'unités du lot	Nombre minimale d'unités à examiner
Si <100 unités	10% des récipients avec un minimum de 4
Si entre [100 – 500] unités	10 récipients
>500 unités	2% des récipients avec un minimum de 20 (ou 10 si grand volume)

Tableau 4: Quantité minimale d'échantillon à utiliser pour chaque milieu pour l'essai de stérilité

La Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) 10e Édition - Direction européenne de la qualité du médicament & soins de santé (edqm.eu)

Quantité par récipient		Quantité minimale à utiliser pour chaque milieu
Liquides	<1 mL	Contenu total
	Entre 1 et 40 mL	La moitié mais pas moins que 1 mL
	Entre 40 et 100 mL	20 mL
	>100 mL	10% mais pas moins que 20 mL
	Liquides antibiotiques	1 mL
Préparation insoluble à mettre en suspension ou émulsion		Contenu total du flacon de façon à obtenir 200 mg
Solides	<50 mg	Contenu total
	Entre 50 et 300 mg	La moitié mais pas moins que 50 mg
	Entre 300 et 5 g	150 mg
	>5 g	500 mg

Méthode

Avant la réalisation de l'essai de stérilité, les milieux de culture doivent être validés par un essai de fertilité et l'applicabilité de la méthode vérifiée sur le produit à analyser.

Pour la réalisation des essais de fertilité et d'applicabilité de la méthode, des souches bactériennes les plus fréquemment rencontrées dans les lignes de production sont utilisées. Ces souches bactériennes sont décrites dans le tableau 5.

Tableau 5: Souches microbiologiques pour essai de fertilité des milieux de cultures et d'applicabilité de la méthode

La Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) 10e Édition - Direction européenne de la qualité du médicament & soins de santé (edqm.eu)

Microorganismes	Souches
Bactéries aérobies	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Bactérie anaérobie	<i>Clostridium sporogenes</i>
Moisissures et levures	<i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus brasiliensis</i>

Essai de fertilité des milieux de culture

L'essai de fertilité est réalisé pour chaque nouveau lot et peut être fait en même temps que l'essai de stérilité. Il permet de vérifier que le milieu de culture utilisé permet le développement des microorganismes s'ils sont présents.

Méthode :

Des petites fractions séparées d'échantillons liquides du milieu thioglycolate sontensemencés avec chacun des microorganismes (*Clostridium sporogènes*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*). Le milieu d'hydrolysate de caséine de soja estensemencé avec *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans* en utilisant une fraction séparée du milieu pour chacune des espèces.

Les bactéries sont incubées pendant 3 jours au maximum et les levures/moisissures pendant 5 jours au maximum.

Résultat et interprétation :

Les milieux conviennent si une croissance des microorganismes est clairement observable : les milieux sont fertiles et peuvent être utilisés pour l'essai de stérilité.

Essai d'applicabilité de la méthode

L'essai permet de vérifier que le produit à analyser (le médicament) n'a pas une action antimicrobienne qui empêcherait la détection de la présence de microorganisme.

L'essai d'applicabilité de la méthode est réalisé lorsque l'essai de stérilité doit être appliqué à un nouveau produit et à chaque fois qu'une modification est apportée aux conditions expérimentales. Il peut être réalisé au même moment que l'essai de stérilité du produit à examiner.

Méthode :

On procède comme pour la réalisation de l'essai de stérilité du produit à analyser en y apportant des modifications. Lors de la filtration sur membrane, une fois, le contenu de chaque récipient est filtré, on ajoute une quantité de microorganismes viables. On procède de même pour chaque souche microbiologique (les mêmes utilisées pour l'essai de fertilité). En parallèles, l'essai de fertilité est réalisé et constitue le témoin positif.

Tous les récipients sont incubés pendant 5 jours maximum.

Résultats et interprétation :

Après incubation, si on observe des colonies visuellement comparables à celles obtenues avec le témoin positif, alors le produit ne possède pas d'activité antimicrobienne dans les conditions de l'essai ou son activité antimicrobienne a été éliminée de façon satisfaisante. Et si on n'obtient pas une croissance microbienne comparable du témoin positif, le produit possède une activité antimicrobienne qui n'a pas été éliminée de façon satisfaisante. Dans ce cas-ci, il faut modifier les conditions de l'essai pour éliminer l'activité antimicrobienne et répéter l'essai d'applicabilité de la méthode.

Essai de stérilité

La méthode de filtration sur membrane est la méthode privilégiée à chaque fois que la nature du produit le permet.

Méthode :

Le contenu du ou des récipients à analyser sont transvasés dans l'appareil de filtration après les avoir dilués si nécessaire avec un diluant stérile pour obtenir le même volume que pour l'essai d'applicabilité de la méthode et sont filtrés immédiatement. Un minimum de quantité du produit à analyser est utilisé comme décrit dans le tableau 4. Si le produit possède une activité antimicrobienne, la membrane est rincée au moins trois fois en filtrant à chaque fois le diluant utilisé. La membrane est ensuite transférée dans le milieu de culture dans des conduits aseptiques. Les poudres solubles, sont d'abord dissoutes dans le solvant approprié (le solvant fourni, l'eau pour préparation injectable, etc.) avant de procéder à la filtration. Les solutions huileuses de faible viscosité peuvent être filtrées sur une membrane sèche. Les huiles visqueuses, les pommades et crèmes sont diluées avec un diluant approprié (myristate d'isopropyle par exemple) avant de les filtrer. Les milieux sont incubés à 37 °C pendant 14 jours.

La méthode par ensemencement direct est utilisée quand la filtration sur une membrane du produit n'est pas possible. Les quantités minimales d'échantillon comme indiqué dans le

tableau 4, sontensemencées directement avec le milieu de culture. Les quantitésensemencées ne doivent pas dépasser 10 pour cent du volume du milieu. Si le produit possède une activité antimicrobienne, elle doit être neutralisée avant l'essai en utilisant un neutralisant approprié ou en effectuant une dilution avec le milieu de culture. Pour les liquides huileux, le milieu est additionné d'un agent émulsionnant à une quantité approprié déterminé lors de l'essai d'applicabilité (ex : Polysorbate 80). Les pommades et crèmes sont mises en émulsion dans un solvant stérile contenant l'agent émulsionnant. Les milieux de cultures sont incubés pendant au moins 14 jours.

Résultats et interprétation :

Les milieux sont examinés plusieurs fois pendant et en fin d'incubation afin de détecter les signes de croissance microbienne. Si le produit induit une turbidité du milieu entraînant une impossibilité de détecter une éventuelle croissance microbienne après les 14 jours d'incubation, l'essai est refait. Des échantillons du milieu trouble (environ 1 mL) sont prélevés puis transférés dans de nouveaux récipients contenant le même milieu de culture initial. Ensuite le milieu trouble et les nouveaux récipients sont incubés pendant 4 jours au minimum.

Si aucun signe de croissance microbienne n'est observé, le produit à examiner satisfait à l'essai de stérilité : le produit est stérile.

Si une croissance microbienne est observée le produit ne satisfait pas à l'essai de stérilité s'il n'est pas clairement démontré que l'essai est non valide indépendamment du produit : le produit n'est pas stérile.

L'essai est considéré comme non valide si une ou plusieurs conditions suivantes sont réalisées :

- Les résultats du contrôle microbiologique des équipements servant aux essais de stérilité font apparaître une anomalie.
- L'examen de la procédure expérimentale utilisée pour effectuer l'essai en question fait apparaître une anomalie.
- Une croissance microbienne est observée pour les témoins négatifs.
- Après l'identification des microorganismes isolés au terme de l'essai, il apparaît que la croissance de cette (ces) espèce(s) est, sans aucun doute possible imputable au matériel ou à la technique utilisés pour la réalisation de l'essai de stérilité.

Si l'essai est considéré non valide, il est refait avec le même nombre d'échantillons. Si une croissance microbienne n'est pas observée, le produit à examiner satisfait à l'essai et si une croissance microbienne est de nouveau observée alors le produit à examiner ne satisfait pas à l'essai de stérilité.

La production de médicaments injectables est un processus qui nécessite une rigueur, le respect des normes et des modalités qui permettent d'assurer leur qualité et leur innocuité. Les essais stérilité et d'endotoxine et le mirage sont les derniers outils de vérification sur le produit fini, c'est pour cela qu'ils doivent être réalisés et interprétés par un personnel compétant. L'essai de stérilité et le mirage sont décrits dans cette partie, et l'essai des endotoxines bactériennes sera décrit dans la partie IV. Mais tout d'abord les endotoxines et leurs toxicités seront définis.

III. Endotoxines bactériennes

III.1 Historique/ Endotoxine

Le terme **pyrogène** est utilisé pour la première fois en 1860 par BURDON Sanderson pour décrire toute substance induisant la fièvre.

En 1883, Mr GRAM met en point une méthode de coloration de la paroi des bactéries permettant de distinguer deux groupes de bactéries : les Gram positives et Gram négatives. Les deux groupes de bactérie diffèrent par la structure de leur paroi par conséquent une pathogénicité différente (Figure 9).

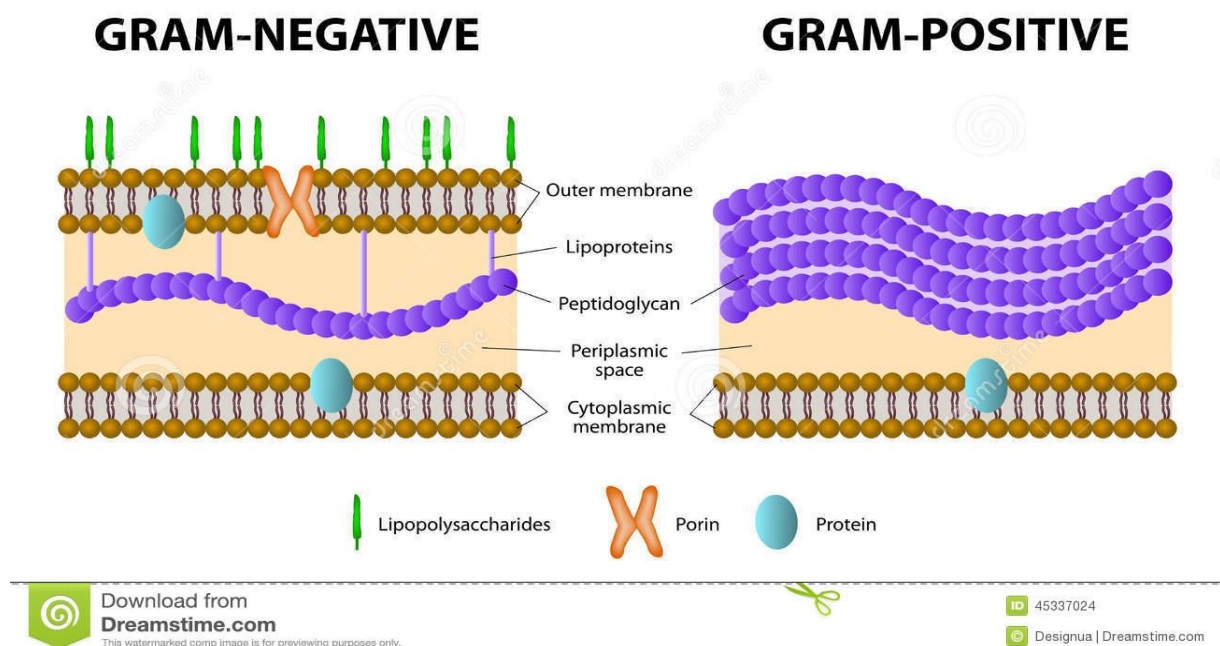


Figure 9: Organisation de la paroi bactérienne : Gram négative vs Gram positive (Dreamstime.com)

En étudiant le Choléra en 1890, Richard PFEIFFERT découvre une toxine qui n'est pas sécrétée dans l'environnement, mais encrée à la paroi du *Vibrio Cholerae* et le nomma « **endotoxine** ».

La relation entre la fièvre et les produits d'origine bactérienne dans les produits injectables sera établie en 1925 par Florence SEIBERT. Elle confirme le facteur responsable : une substance bactérienne des bactéries à Gram négative.

Ce n'est que 15 ans plus tard qu'une étude de la FAD (food administration and drug) est réalisée en injectant des filtrats de bactéries à Gram négative aux lapins. Cette étude a permis de mettre en place un protocole d'essai des substances pyrogènes et d'établir ses critères d'acceptation. L'essai sur les lapins sera détaillé dans la partie détection des endotoxines.

En 1977, le test de lysat d'amœbocytes limule (LAL) est utilisé comme test alternative à l'essai sur le lapin pour l'essai d'endotoxine. COOPER & LEVIN & WAGNER ont effectué plusieurs tests

comparatifs entre l'essai sur le lapin et l'essai LAL des endotoxines d'*Escherichia coli* et *Klebsiella spp.* Mais avant cette étude sur les LAL, plusieurs autres découvertes ont été faites. D'abord HOWELL, découvre en 1885 que les limules mouraient par coagulation intravasculaire lorsqu'elles sont infectées par des bactéries à Gram négative et met en évidence le rôle primordial des amœbocytes de l'hémolymphe de limule dans cette coagulation. Par la suite LEVIN, découvre 1956 que les amœbocytes sont les seules cellules circulantes de l'hémolymphe de limule et confirme leur rôle dans la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) en injectant le *Vibrio cholerae* au *limulus polyphemus*. Des études effectuées par LEVIN et BANG entre 1960-1968 ont mis en évidence la relation de proportionnalité entre le taux de gélification du lysat, la turbidité du mélange et la concentration des endotoxines et ont rendu possible l'utilisation du LAL pour la détection des endotoxines.

III.2 Définition :

Les endotoxines bactériennes sont des lipopolysaccharides (LPS) présents sur la membrane des bactéries à Gram négatif et des cyanobactéries. Les lipopolysaccharides sont la définition biochimique des endotoxines. Les LPS sont constitués d'une région polysaccharidique à longues chaînes et de l'antigène O constitué d'unités oligosaccharidiques, qui sont liées par un lipide spécifique, le lipide A de la membrane externe des bactéries à Gram négative. (figure 9).

Les LPS jouent un rôle sur la protection de la bactérie :

- La partie hydrophile se polymérise et leur permet de s'adapter sur différents supports (verre, plastique, etc.).
- Les chaînes O-Spécifiques sont immunogènes et sont à l'origine de la réaction immunitaire chez l'hôte.
- Le lipide A est responsable de l'activité immunostimulante.

Le lipide A est libéré après la mort cellulaire bactérienne et il est responsable de l'effet pyrogène, du choc septique et de la dégradation de l'état général pouvant entraîner la mort. Le lipide A est composé d'une partie hydrophile chargée négativement constituée de diglucosamine bisphosphorylée et d'une partie hydrophobe composée de chaînes acycliques liées par des liaisons amides et esters. Grâce à la spécificité de sa structure, le lipide A est responsable de la spécificité de la réponse immunitaire et de l'affinité de la structure de LPS avec les récepteurs chez l'hôte.

La partie hydrophile est le noyau du LPS, elle est constituée de polysaccharides. Son extrémité interne est directement liée au lipide A et l'extrémité externe comporte le site de fixation de l'antigène O spécifique.

Les chaînes O spécifique (l'antigène O) sont exposées à l'environnement externe des bactéries. L'antigène O permet à la bactérie d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Cette région est variable, ils peuvent exister sous plusieurs variants chez la même espèce (plus de mille variants distincts chez *Salmonella*) mais cette région peut aussi ne pas exister dans certains LPS.

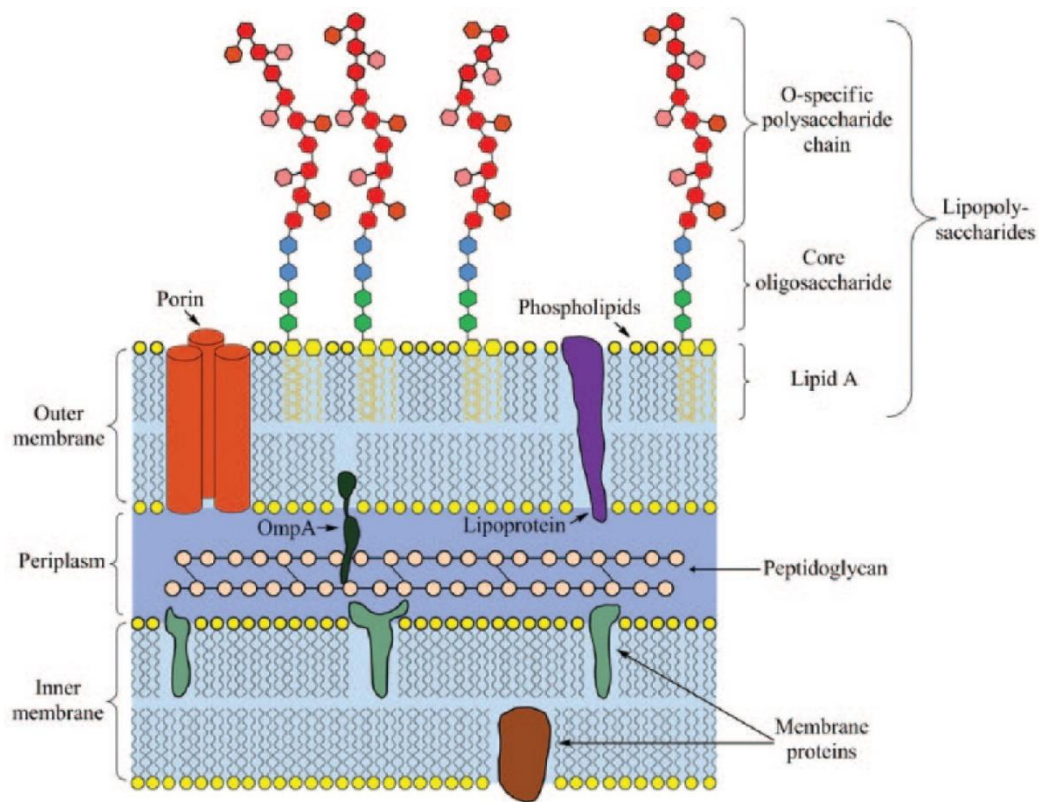


Figure 10: Structure des endotoxines (2)

Les endotoxines ne sont pas les seules substances pyrogènes, il existe d'autres pyrogènes d'origine virale, minérale ou microbienne (toxine de *Staphylococcus aureus*, levures, moisissures) mais elles restent de loin les pyrogènes les plus puissants et stables. Dans cette thèse, uniquement les pyrogènes endotoxiniques seront abordés (figure 11).

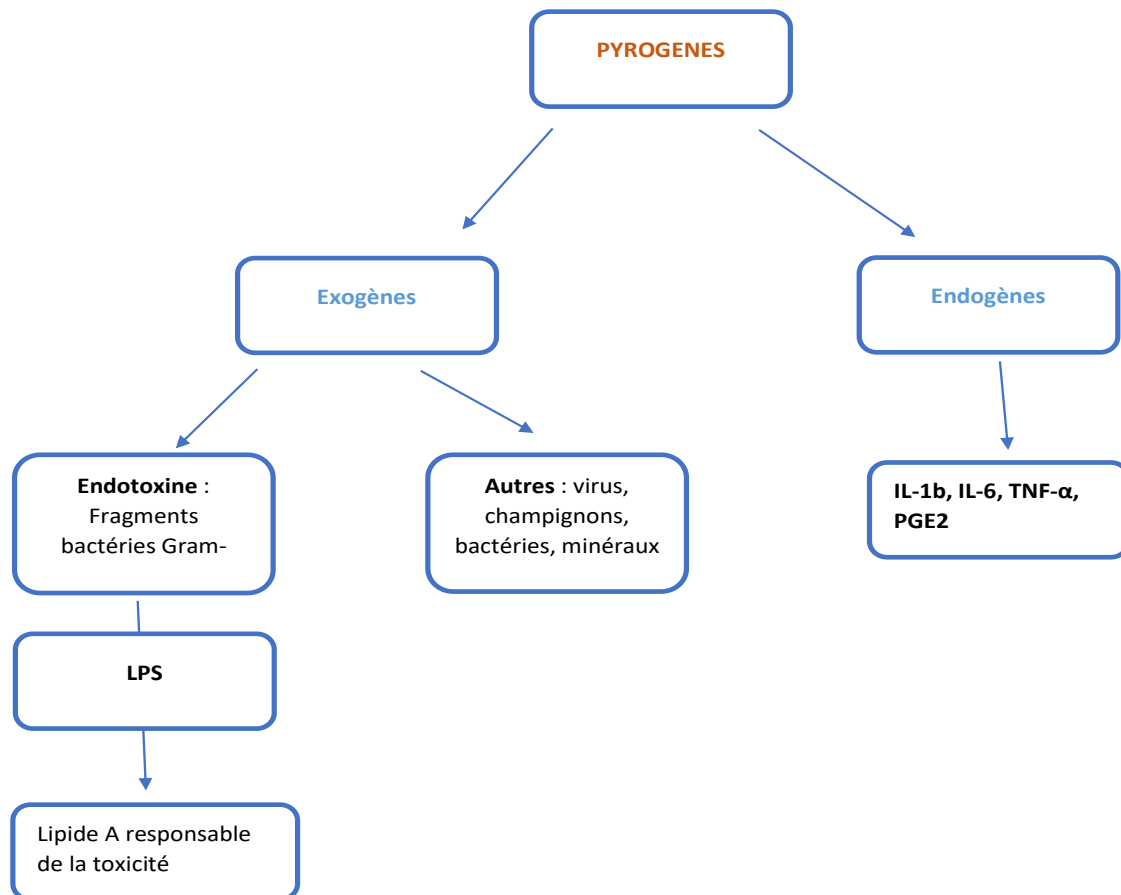


Figure 11: Les différents types de Pyrogènes

III.3 Toxicité des endotoxines :

Les endotoxines présentes dans les préparations injectables sont toxiques même à l'état de trace, ce sont des éléments pyrogènes entraînant des réactions inflammatoires importantes.

Ils sont difficiles à éliminer car ils sont :

- Insolubles dans l'alcool
- Solubles dans l'eau
- Thermostables, résistent à des températures élevées
- Non retenus par les procédés de filtration stérilisante
- Non détruits par les procédés de stérilisation terminale

Au cours d'un processus infectieux, lors de la lyse cellulaire des bactéries à Gram négatif, les LPS sont libérés dans l'environnement. En accédant au sang de l'homme, les LPS peuvent entraîner une endotoxémie (présence d'endotoxine dans le sang). Les LPS peuvent affecter le fonctionnement des organes, augmenter la température corporelle, induire un dysfonctionnement des réactions inflammatoires via l'induction de la libération massive des cytokines inflammatoires (interleukines, facteur de nécrose tumorale,). La suractivation de la

réponse immunitaire innée entraîne un syndrome inflammatoire systémique, une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins, une vasodilatation et une hypotension à l'origine d'un choc systémique.

L'endotoxémie peut être d'origine métabolique caractérisée par une absence d'infection bactérienne évidente avec une réaction inflammatoire de bas grade, dans ce cas l'endotoxine provient principalement de la flore bactérienne (flore intestinale, flore buccale, ...) ou alors l'endotoxémie est induite par une infection bactérienne sévère, souvent d'origine exogène.

Dans l'endotoxémie métabolique les bactéries de la flore libèrent les endotoxines lors de la lyse cellulaire qui peuvent traverser les barrières physiologiques pour atteindre la circulation sanguine. Ces mécanismes de passage peuvent être :

- La co-absorption : transport facilité des LPS par les chylomicrons lors de la digestion des lipides.
- La diffusion passive entre les cellules épithéliales de la barrière intestinale : c'est un phénomène hyperperméabilité.
- Translocation bactérienne observée lorsque la muqueuse est agressée permettant le passage des LPS dans les ganglions mésentériques puis dans les organes.

Nous allons nous intéresser à l'endotoxémie d'origine exogène plus précisément celle induite par les médicaments injectables contaminés.

IV. Méthodes de recherche des endotoxines

Au fil des années, plusieurs méthodes de détection des endotoxines dans les préparations injectables ont vu le jour. Le premier test utilisé est l'essai sur le lapin qui est un test *in vivo*. Par la suite, le test *in vitro* LAL a été utilisé pour la détection des endotoxines. Les tests LAL présentent plusieurs avantages par rapport au test *in-vivo* notamment en évitant l'utilisation des lapins. Cependant, les tests LAL présentent aussi des limites comme la présence d'interférences pouvant fausser les résultats. D'autres méthodes plus récentes sont aussi utilisées comme le test d'activation des monocytes (MAT) et le facteur C recombinant.

Ces différentes méthodes seront présentées par la suite.

IV.1 Test pyrogène de lapin

Le test *in vivo* chez le lapin est la première technique standard approuvée par la FAD pour la détection des endotoxines. L'essai est décrit dans la pharmacopée Européenne, Américaine et Japonaise. Développé dans les années 1920, le test se base sur l'élévation de la température chez le lapin induite par l'injection d'une solution témoin contenant l'endotoxine. En partant d'un groupe homogène de lapin, deux groupes sont constitués. Un groupe A reçoit en injection la solution témoin et l'autre groupe B reçoit la solution à tester. Le groupe A est le groupe témoin, il permet de vérifier la réponse des lapins après une injection d'endotoxine donc l'élévation de la température. Si on observe une élévation de température chez le groupe B, il est conclu que le produit testé contient des endotoxines et dans le cas contraire, une absence d'endotoxine.

Le test pyrogène chez le lapin est un test qualitatif, il permet juste de conclure sur la présence ou non d'endotoxines dans le produit testé. Le test est cher, les résultats sont longs et l'utilisant des lapins cause un problème d'éthique. Actuellement, le test pyrogène n'est fait qu'en complément des tests LAL sur les matériaux à la phase de développement des produits parentéraux.

IV.2 Essai des endotoxines bactériennes (EEB) : LAL

L'essai des endotoxines bactériennes se base sur la réaction du lysat d'amœbocytes de limule en contact des endotoxines.

L'essai des endotoxines bactériennes permet de détecter ou de quantifier les endotoxines des bactéries à Gram négatif en utilisant le lysat d'amœbocytes de limule (LAL). Les tests *in vitro* LAL remplacent le test de routine *in vivo* réalisé sur le lapin. Pour réaliser le test LAL trois techniques sont décrites dans la pharmacopée européenne : la technique gel par induction d'un gel, la technique turbidité (turbidité par clivage d'un substrat endogène) et la technique colorimétrique (coloration par clivage d'un complexe peptide-chromogène synthétique). Avec ces trois techniques, 6 méthodes sont d'écrites dans le chapitre 6.2.14 de la pharmacopée européenne, et ce chapitre fait l'objet d'harmonisation (Europe, Amérique, Japon).

- Méthode A : gélification : essai limite
- Méthode B : gélification : essai semi-quantitatif
- Méthode C : turbidité cinétique
- Méthode D : calorimétrie cinétique
- Méthode E : calorimétrie en point final
- Méthode F : turbidité en point final

Chacune de ses méthodes peut être utilisée pour l'essai des endotoxines, mais s'il y a doute, la méthode A doit être privilégiée s'il n'y a pas de recommandation dans la monographie du produit.

L'appareillage résistant à la chaleur (verrerie) est dépyrogéné dans un four à chaud pendant 30 min à 250° C au minimum. Cette méthode de dépyrogénéation doit être validée. Pour les autres appareils qui ne résistent pas à la chaleur, l'absence d'interférence et de contamination par les endotoxines doivent être prouvées avant leur utilisation dans l'essai. Par rapport à l'environnement et le personnel, les conditions de travail doivent permettre d'éviter toute contamination par des endotoxines.

- Limule : présentation

La Limule communément appelée « crabe fer à cheval » est un arthropode de la classe des Mérostomes, de l'ordre des Arachnides et de la famille des Limulidae (figure12). C'est un fossile vivant marin âgé de plusieurs millions d'années. Il existe plusieurs espèces de Limule : *Limulus polyphemus*, *Tachypleus tridentatus*, *Tachypleus gigas*, *Carcinoscorpus rotundicauda*, on les retrouve dans différentes régions du monde. Le genre *Limulus* est localisé sur la côte Est d'Amérique et les genres *tridentatus* et *Carcinoscorpus* en Asie. Dans la pharmacopée

européenne, l'essai des endotoxines sont d'écrits avec le lysat d'amoebocytes des espèces *Limulus polyphemus* et *Tachypleus tridentatus*.

Le sang de limule a la particularité de coaguler en contact des endotoxines, il a été prouvé que les amoebocytes, les seules cellules circulantes de l'hémolymph de limule sont responsables de cette réponse. Le sang de limule est bleu, il contient de l'hémocyanine à la place de l'hémoglobine chez l'homme.



Figure 12: Limule (Aquaportail)

- Obtention du lysat d'amoebocytes

Le lysat est obtenu à partir des cellules sanguines du sang de limule qui sont les amoebocytes. Les limules sont acheminées au laboratoire pour prélever leur sang, 150 à 250 ml de leur sang sont prélevés sous anticoagulant (figure 13). Si le sang de limule coagule pendant le prélèvement, l'échantillon ne pourra pas être utilisé donc pour l'éviter, on leur injecte un anticoagulant.

Le sang prélevé est centrifugé pour séparer les amoebocytes, le culot cellulaire est lavé et ensuite les amoebocytes sont lysés. Le lysat est mis dans des flacons puis lyophilisé.

La sensibilité de chaque lot est mesurée pour éviter les interférences lors de la réalisation des tests. La sensibilité est la quantité minimale d'endotoxine qui peut entraîner une coagulation du lysat dans les conditions normales.



Figure 13: Prélèvement de sang de limule (fr.quora.com)

- Solution de Lysat

Le lysat d'amœbocytes est dissoute par faible agitation dans de l'eau EEB (eau pour essai des endotoxines bactérienne) ou dans un tampon selon les recommandations du fabricant du lysat pour obtenir une solution de lysat homogène. La solution de lysat est ensuite conservée selon les recommandations du fabricant (au réfrigérateur ou congélateur). La solution de lysat d'amœbocytes est le réactif de l'essai endotoxine bactérienne.

- Eau EEB

L'eau EEB est une eau qui n'a pas d'interférence avec le lysat d'amœbocytes. EEB peut être une eau pour préparation injectable ou obtenue par une autre procédé, mais justifiant une absence d'interférence dans la limite de détection du réactif.

- Produit à analyser

Le produit à analyser est mis en solution, il est dilué (si liquide) ou dissout (si solide) dans de l'eau EEB si la spécification le permet sinon une autre eau peut être utilisée si elle est plus appropriée. Le pH de la solution à analyser est ajusté par rapport à la solution de lysat pour que les deux pH soient compris dans l'intervalle indiqué par le fabricant du lysat. Un acide et une base, sous forme solide ou liquide ou un tampon peuvent être utilisés pour ajuster le pH. L'acide, la base ou le tampon doivent être exempte d'endotoxine dans la limite détectable et ne doivent pas être source d'interférence. Ceci doit être vérifié avant leur utilisation.

- Critères de validité de la courbe d'étalonnage (pharmacopée Européenne chap 2.6.12)

La concentration limite en endotoxine (L.E.C) est le premier critère à déterminer. La LEC est la limite en endotoxines d'une substance administrée par voie parentérale, elle est calculée par la formule suivante $L.E.C = K / M$

K : dose en endotoxine en UI d'endotoxine par poids corporel et par heure que l'on peut administrer à un patient par voie parentérale sans effet toxique.

$K = 5 \text{ UI/Kg.h}$ par voie intraveineuse

$K = 2.5 \text{ UI/Kg.h}$ produit de contraste IV

$K = 0.2 \text{ UI/Kg.h}$ par voie intrarachidienne

M : la dose maximale recommandée pour le produit en bolus par Kg de masse corporelle. Si le produit est en injections rapprochées ou perfusion continue M est la dose maximale par heure.

La concentration limite en endotoxine est définie pour chaque nouveau produit et dépend de la voie d'administration.

La dilution maximale significative (D.M.S) est ensuite déterminée pour la gamme d'étalonnage. Le DMS est la dilution maximale d'un échantillon à laquelle la limite en endotoxine peut être déterminée et calculée en utilisant la formule suivante. $DMS = E.L.C / \lambda$

λ : est la sensibilité du lysat pour la technique gélification, et la concentration la plus basse de la courbe d'étalonnage pour les techniques turbidimétrique et calorimétrique. Elle est exprimée en UI/mL.

- Les solutions d'étalon d'endotoxine

La solution mère d'endotoxine est obtenue à partir d'une solution référence d'endotoxine qui est étalonnée par rapport à l'étalon international. La teneur en endotoxine est exprimée en unité internationale UI. Des kits d'endotoxine pour PPC (produit positif control) sont disponibles à la vente. A partir de la solution mère d'endotoxine une série de dilution successive est faite avec de l'eau EEB. La gamme d'étalon va dépendre de la sensibilité du lysat de la DMS et de la technique utilisée.

IV.2.1 Technique GEL (Méthode A et B)

La technique de gélification permet la détection (méthode A) ou la quantification (méthode B) des endotoxines par la capacité du lysat d'amœbocytes de coaguler en contact de l'endotoxine. Lorsque les cellules d'amœbocytes sont en contact avec l'endotoxine, une cascade enzymatique passant par l'activation du facteur C (FC), transforme la coagulogène en coaguline (et peptide C) qui entraîne la formation de gel (coagulation). Le mécanisme de cette technique est décrit dans la figure 14.

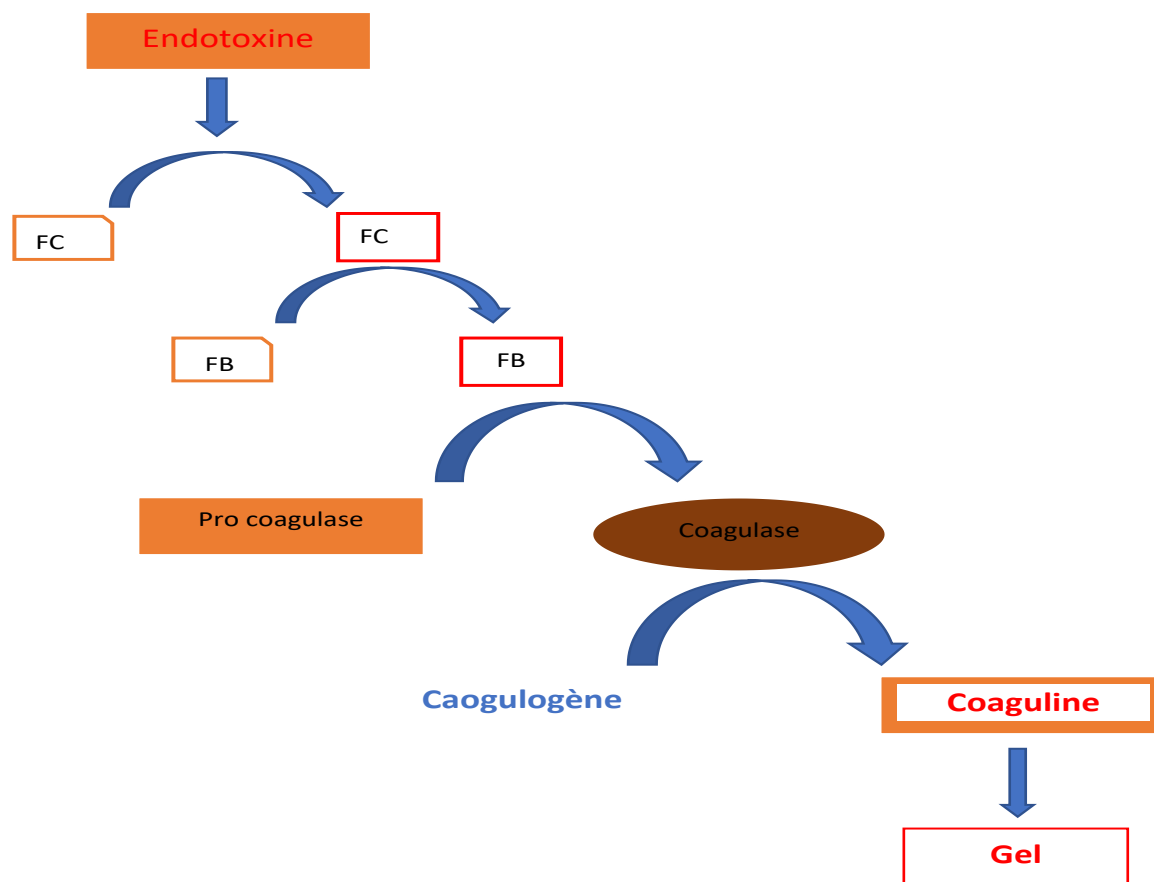


Figure 14: Réaction de gélification induite par les endotoxines

Avant la réalisation du test pour chaque nouveau lot de LAL certains contrôles sont à effectuer avant le premier essai pour valider la méthode. Ces contrôles permettront de confirmer la sensibilité déclarée du lysat (λ) et vérifier l'absence d'interférence entre le produit à analyser et le lysat.

- Vérification de la sensibilité du lysat λ

La sensibilité déclarée est vérifiée pour chaque nouveau lot ou si des modifications sur les conditions de l'essai peuvent influencer sur les résultats. La solution mère d'endotoxine est diluée avec de l'eau EEB de telle sorte à avoir 4 concentrations successives égales à 2λ , 1λ , 0.5λ et 0.25λ . Chaque concentration d'endotoxine est répliquée en 4 exemplaires, on obtient finalement 16 tubes. On ajoute dans chaque tube 100 μ de la solution de lysat d'amœbocytes (si le lysat est lyophilisé dans des flacons ou ampoules, on ajoute directement les solutions

d'endotoxine dans le flocon ou ampoule) en suite le mélange est incubé à une température et à une durée, indiquées par le fabricant en évitant les vibrations. Le plus souvent, le mélange est à incuber à 37 °C +/- 1° C pendant 60 min +/- 2min. La composition des tubes est schématisée dans la figure 15.

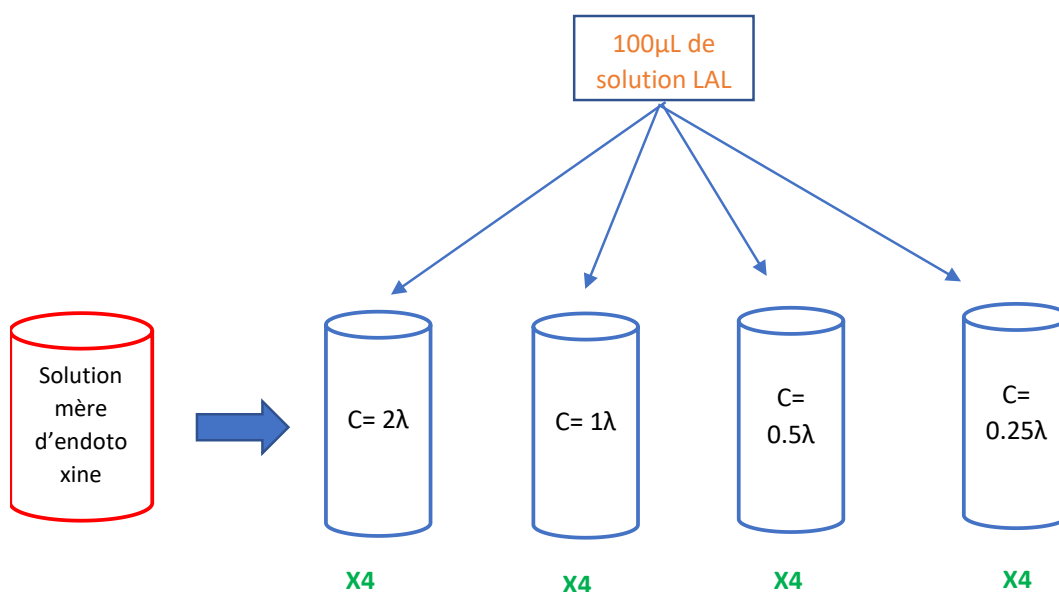


Figure 15: Préparation des solutions pour vérification de la sensibilité déclarée de la méthode de gélofification

Pour le résultat, les tubes sont sortis de l'incubateur un à un, ils sont incurvés de 180° d'un seul mouvement, si un gel se forme et reste au fond du tube le test est positif, si pas de formation de gel le test est négatif.

La validité de l'essai est approuvée que si le test est négatif sur les 4 exemplaires de l'échantillon avec la plus faible concentration (0.25λ).

Pour valider ou non la sensibilité déclarée, la concentration au point final de chaque série de dilution est calculée, ensuite leur moyenne logarithmique déterminée et enfin la moyenne logarithmique de concentration au point finale est calculée en prenant l'antilog de la moyenne logarithmique en utilisant la formule suivante.

Moyenne géométrique des concentrations au point final = $\text{Antilog} \frac{\sum e}{f}$

La concentration au point final est la plus faible concentration dans une série de dilution de solution d'endotoxine entraînant une gélofification en contact avec le lysat.

$\sum e$ = logarithme de la somme des concentrations au point final

f = nombre d'exemplaires

Le résultat obtenu est la sensibilité mesurée du lysat, elle est exprimée en UI/mL.

Interprétation : si la sensibilité mesurée est comprise entre $[0.5 \lambda - 2 \lambda]$ bornes incluses, la sensibilité déclarée est confirmée pour ce lysat.

- **Vérification des facteurs d'interférence**

Les facteurs d'interférences sont tous les éléments pouvant influencer la réponse du lysat d'amœbocytes en présence ou en absence d'endotoxines. Ces éléments peuvent être activateurs ou inhibiteurs de cette réponse. La recherche d'interférence sur une solution à examiner est effectuée à chaque fois qu'une modification pouvant influencer sur les résultats de l'essai est faite. Avant la recherche d'interférence, la vérification de la sensibilité déclarée est toujours faite en première.

Pour la vérification d'interférence, quatre solutions distinctes de mélange différent sont formées : la solution 1 contient que l'échantillon à analyser et est reproduite en 4 exemplaires. La solution 2 contient l'échantillon à analyser et l'endotoxine concentré à 2λ , elle est ensuite diluée pour obtenir 4 concentrations (2λ , 1λ , 0.5λ et 0.25λ) qui sont répliquées en 4 exemplaires chacune. La solution 3 contient uniquement l'endotoxine concentré à 2λ , elle est diluée dans de l'eau EEB pour obtenir 4 concentrations (2λ , 1λ , 0.5λ et 0.25λ) qui sont dupliquées chacune. La solution 4 est de l'eau EEB qui est ensuite dupliquée.

Les échantillons sont préparés comme dans la figure 16.



Figure 16: Préparation des solutions pour la recherche d'interférence pour la méthode de gélification

La solution 2 est le contrôle d'interférence, la solution 3 est le témoin de la sensibilité déclarée (gamme d'étalon identique à celle pour la vérification de la sensibilité) et la solution 4 est le témoin négatif.

Réalisation :

100µL de LAL sont ajoutés dans chaque tube avant incubation à 37 °C pendant 60 min. Les tubes sont ensuite retournés d'un mouvement à 180°. Si un gel solide est formé et reste au fond du tube, le résultat est positif au cas contraire, il est négatif.

Interprétation

- Le test est valide que si tous les exemplaires des solutions 1 et 4 sont négatifs et que les résultats de la solution 3 confirme la sensibilité déclarée.
- La sensibilité déclarée du lysat est vérifiée dans les solutions 2 et 3 en utilisant la même formule (moyenne géométrique au point final= $\text{Antilog} \frac{\sum e}{f}$).
- Si la valeur trouvée pour la solution 2 est comprise entre $[0.5 \lambda - 2 \lambda]$ bornes incluses, l'échantillon analysé ne présente pas d'interférence avec le LAL dans les conditions expérimentales, si la valeur est en dehors de cet intervalle, il y a interférence.

S'il y a interférence et que la plus grande dilution est inférieure à la DMS, on peut refaire la même série d'essai en augmentant la dilution sans dépasser la DMS.

Un lot de LAL de sensibilité plus élevée permettrait d'avoir une DMS plus importante et les dilutions pourront être plus poussées permettant d'éliminer les interférences.

Une fois, les contrôles préliminaires sont effectués et que la sensibilité déclarée est confirmée et la présence d'interférence exclue, l'essai de recherche d'endotoxine peut être fait.

IV.2.1.1 Gélification : Méthode A (essai limite)

C'est la méthode de référence de l'essai des endotoxines. Le principe est la détection d'endotoxine par la formation de gel induit par l'endotoxine en contact avec le LAL. Le résultat de l'essai nous permet juste de statuer sur la présence ou non d'endotoxines dans l'échantillon à analyser.

- Réalisation

On prépare quatre solutions de composition différentes. La solution 1 est l'échantillon à analyser. La solution 2 contient l'échantillon à analyser dans laquelle on ajoute l'endotoxine à 2λ . La solution 3 est une solution d'endotoxine à 2λ dans de l'eau EEB et la solution 4 est de l'eau EEB. Les solutions 1 et 2 sont préparées en utilisant des dilutions inférieures ou égales à la DMS. Chaque solution est dupliquée en 2 exemplaires et dans chaque exemplaire, on ajoute 100 μL de LAL, puis ils sont incubés à 37°C pendant 60 min. La formation de gel est vérifiée en inclinant les tubes d'un mouvant à 180° . Si un gel solide se forme et reste au fond du tube, le test est positif au cas contraire, il est négatif. La solution 2 est le témoin positif produit, la solution 3 est le témoin positif et la solution 4 est le témoin négatif. La préparation des échantillons est décrite dans la figure 17.

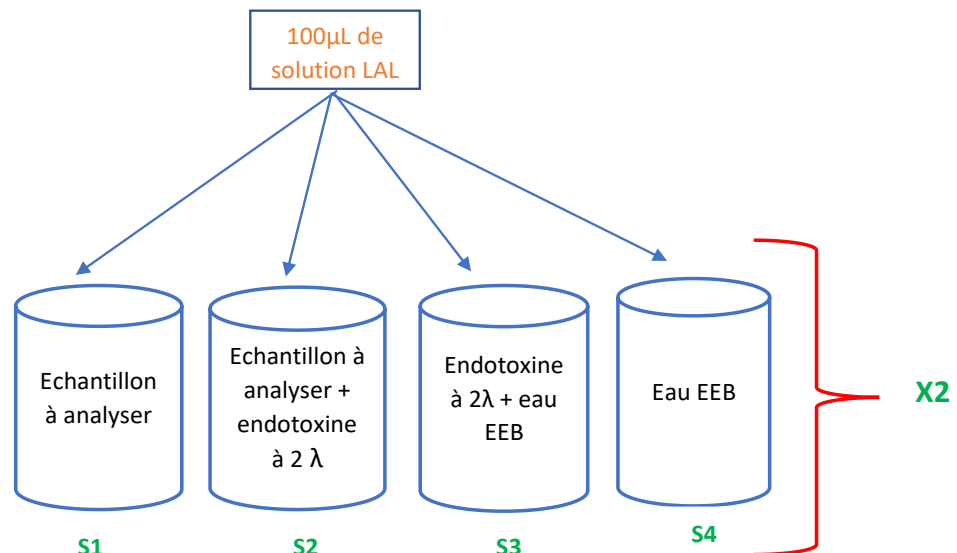


Figure 17: Préparation des solutions pour l'essai gélification par la méthode A

Validité de l'essai

Les résultats obtenus avec les 2 exemplaires des solutions 2 et 3 sont positifs et les résultats des 2 exemplaires de la solution 4 sont négatifs.

- Interprétation

L'échantillon à analyser satisfait à l'essai si les 2 résultats obtenus avec la solution 1 sont négatifs : il n'y a pas d'endotoxines détectables dans la solution analysée.

L'échantillon à analyser ne satisfait pas à l'essai si les 2 résultats ou un des 2 résultats de la solution 1 sont positifs. Dans ce cas-ci, si les dilutions sont inférieures à la DMS, on peut refaire l'essai en augmentant les dilutions sans dépasser la DMS.

IV.2.1.2 Gélification : Méthode B (essai semi-quantitatif)

En plus de la détection, cette méthode permet une quantification des endotoxines dans la solution. La concentration d'endotoxines est quantifiée par les concentrations au point final.

- Réalisation

4 solutions sont préparées comme dans l'essai limite et les solutions 2 et 4 sont dupliquées. La solution 1 est la solution avec laquelle les recherches d'interférences ont été faites, elle est ensuite diluée successivement à $\frac{1}{2}$ avec de l'eau EEB pour obtenir 4 concentrations différentes. La solution 3 est aussi diluée successivement à $\frac{1}{2}$ pour obtenir des concentrations de 2λ , 1λ , $0,5\lambda$ et $0,25\lambda$ qui sont ensuite dupliquées.

Les dilutions de la solution 1 doivent être inférieures ou égales à la DMS. La préparation des solutions est décrite dans la figure 18.

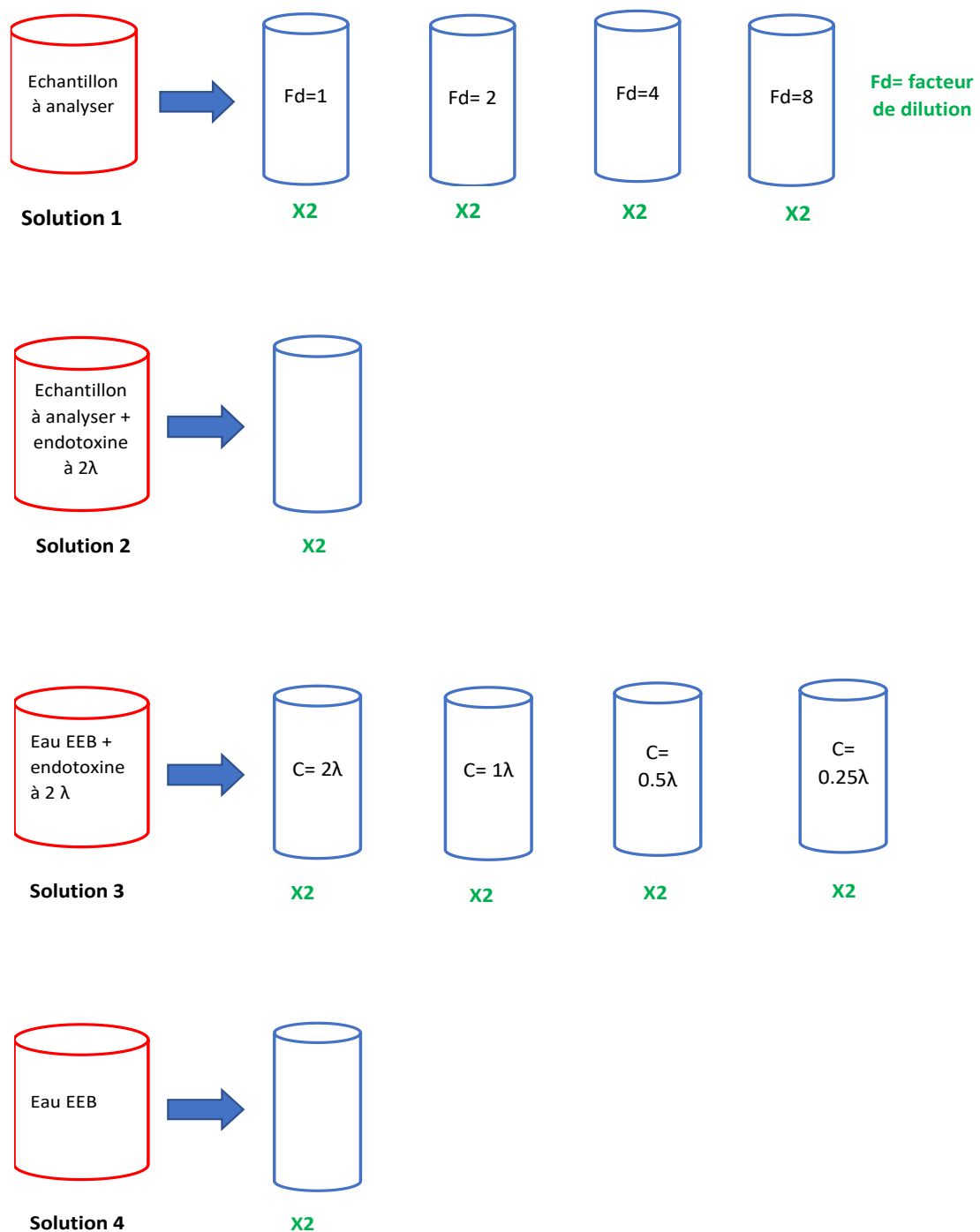


Figure 18: Préparation des solutions pour l'essai de gélification par la méthode B

Dans chaque tube, on ajoute le LAL avant incubation à 37 °C à 60 min. La formation de gel est vérifiée par retournement d'un trait à 180° des tubes, si un gel solide se forme et reste au fond du tube le test est positif au cas contraire, il est négatif.

- Validité du test

Les 2 résultats obtenus avec la solution 2 (témoin positif produit) sont positifs.

Les 2 résultats obtenus avec la solution 4 (témoin négatif) sont négatifs.

La moyenne géométrique des concentrations au point final obtenue avec les solutions 3 est comprise entre $[0.5\lambda - 2\lambda]$ bornes incluses.

- Résultat

La concentration en endotoxines de l'échantillon à analyser est la concentration au point final des gammes de solution. Si la solution 1 était prédiluée pour l'essai, la concentration au point final des gammes est multipliée par le facteur de dilution pour obtenir la concentration en endotoxines dans l'échantillon à analyser. La moyenne géométrique des concentrations au point final est calculée avec la formule décrite dans les essais préliminaires ($= \text{Antilog} \frac{\sum e}{f}$, $\sum e =$ logarithme de la somme des concentrations au point finale, $f =$ nombre d'exemplaires)

- Interprétation

Si la concentration en endotoxines des gammes de l'échantillon à analyser est inférieure à la limite spécifiée par la monographie, l'échantillon à examiner satisfait à l'essai.

La concentration en endotoxines est inférieure à la sensibilité déclarée (λ) si toutes les dilutions de l'échantillon à analyser donnent un résultat négatif. Et si l'échantillon est prédilué la concentration en endotoxines est inférieure au plus petit facteur de dilution multiplié par la sensibilité déclaré (λ).

Si toutes les gammes de dilution de l'échantillon à analyser donnent un résultat positif, la concentration en endotoxines est supérieure ou égale au plus grand facteur de dilution multiplié par la sensibilité déclarée (λ). Et si l'échantillon à analyser est prédilué, on multiplie en plus par le facteur de dilution initial pour avoir la concentration en endotoxines.

Les méthodes gélification (A : qualitative et B : semi-quantitative) sont très sensibles pour la détection des endotoxines, mais ne permettent pas de les quantifier. Les méthodes calorimétriques et de turbidité permettent une quantification des endotoxines.

IV.2.2 Essais quantitatifs (Méthode C, E, F et D)

Les méthodes quantitatives permettent de quantifier les endotoxines présentes dans l'échantillon à analyser. Les méthodes E (calorimétrie en point final) et D (calorimétrie cinétique) sont des techniques chromogéniques et les méthodes C (turbidité en point final) et F (turbidité cinétique) des techniques turbidimétriques. Des contrôles préliminaires sont à faire avant d'effectuer l'essai pour ces deux techniques. Les principes des essais seront détaillés par la suite mais ces techniques peuvent être automatisées.

IV.2.2.1 Les contrôles préliminaires

Pour les techniques turbidimétrique et chromogénique certains critères sont à vérifier pour chaque nouveau lot de lysat et si des changements dans les conditions expérimentales pouvant modifier le résultat sont apportés. Les critères de validité de la courbe d'étalonnage et l'absence d'interférences dans la solution à analyser sont à vérifier avant d'effectuer l'essai. Ces vérifications permettent de valider et de s'assurer de la fidélité de l'essai.

- Critères de validité de la courbe d'étalonnage

La validité de la courbe d'étalonnage est vérifiée pour chaque nouveau lot de lysat. Le temps de réaction (T_r) nécessaire pour atteindre une absorbance prédéfinie, l'apparition de la turbidité (technique turbidimétrique) ou de la coloration jaune (technique chromogénique) est inversement proportionnelle à la concentration en endotoxine, c'est-à-dire plus la concentration en endotoxines est importante plus le temps d'apparition de la turbidité ou de la coloration jaune est plus rapide.

Les solutions sont préparées comme suit : 3 solutions de concentrations différentes en endotoxines, mais comprises dans l'intervalle de concentration voulue (indiqué par le fabricant du lysat) sont préparées puis chaque solution est répliquée en 3 exemplaires au minimum. Les solutions d'endotoxines sont diluées avec de l'eau EEB, les 9 tubes ainsi qu'un tube contenant que l'eau EEB (le blanc) sont lus par un photomètre à une longueur d'onde donnée (450 nm). La courbe d'étalonnage est obtenue par régression linéaire du log du temps de réaction en fonction du log de la concentration en endotoxines des solutions étalon et on obtient ainsi une droite.

Les critères de la courbe d'étalonnage sont validés que si la valeur absolue du coefficient de corrélation de la droite est supérieure ou égale à 0.980 dans l'intervalle de concentration voulue.

- Recherches d'interférences

Pour la recherche d'interférences, 4 solutions sont préparées et chacune répliquée en 2 exemplaires au minimum. La solution 1 ne contient que l'échantillon à analyser à une dilution n'excédant pas la DMS. La solution 2 est constituée de l'échantillon à analyser à la même dilution que dans la solution 1 avec une concentration en endotoxines équivalent à la concentration médiane de la courbe d'étalonnage (ou s'en rapprochant le plus possible). Les solutions 3 sont diluées dans le l'eau EEB, elles sont au moins 3 concentrations en endotoxines différentes dont la plus faible est λ . Ces 3 solutions sont les même que celles utilisée pour la

vérification des critères de validité de la courbe d'étalonnage. La solution 4 est uniquement de l'eau EEB. Ces solutions sont préparées selon les recommandations du fabricant du lysat qui fournit les instructions avec le kit de test (figure 19).

Les solutions 3 sont les témoins positifs et la solution 4 est le témoin négatif et est considérée comme le blanc pour la lecture des absorbances.

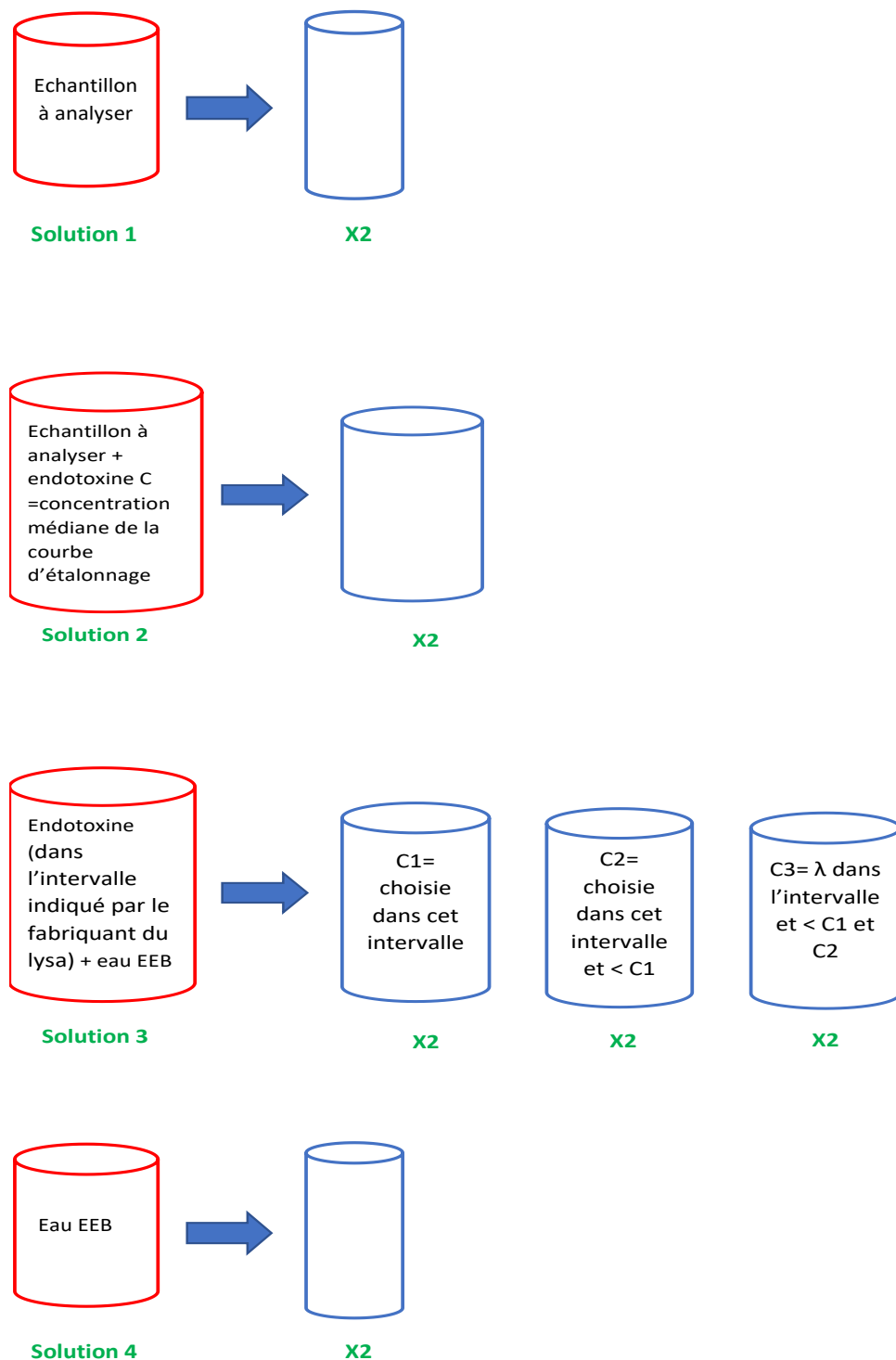


Figure 19: Préparation des solutions pour la recherche d'interférences des essais de turbidité/calorimétrique

Les tubes sont lus par spectrophotométrie, les résultats de la solution 3 permettent de tracer la courbe d'étalonnage si les conditions sont vérifiées, et avec les autres solutions les concentrations en endotoxines sont calculées en reportant les absorbances sur la courbe d'étalonnage et en utilisant l'équation de la droite.

La concentration moyenne en endotoxines ajoutées est calculée en soustrayant la moyenne des concentrations obtenue des solutions 1 (l'échantillon uniquement) de la moyenne des concentrations des solutions 2 (échantillon + endotoxines ajoutées).

Validité de l'essai de la recherche d'interférences

Le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage obtenu avec les solutions 3 est supérieur ou égale 0.980 en valeur absolue.

La solution 4 donne un résultat (concentration en endotoxines) inférieur à la sensibilité déclarée (λ) du lysat ou son absorbance n'est pas supérieure, à la limite spécifiée par le fabricant du lysat.

Interprétation

Si la concentration calculée en endotoxines ajoutées est comprise entre 50% et 200% de la concentration connue en endotoxines ajoutée, l'échantillon à analyser ne contient pas d'interférences.

Si la concentration calculée en endotoxines ajoutées n'est pas comprise entre 50% et 200% de la concentration connue en endotoxines ajoutée, l'échantillon à analyser contient des interférences. Dans ce cas, on peut augmenter les dilutions sans dépasser la DMS et refaire l'essai.

Si la présence d'interférences est confirmée même si les dilutions sont augmentées, l'échantillon à analyser, peut-être traité par filtration, neutralisation, par dialyse ou chauffage. Ces procédés doivent être validés et la recherche d'interférences est refaite avec le même échantillon traité pour s'assurer qu'il n'y a pas eu de perte en endotoxines dû au traitement pour neutraliser les interférences.

IV.2.3 Technique turbidité (Méthodes C et F)

L'endotoxine en contact avec les amœbocytes entraîne une activation du facteur C aboutissant au clivage du coagulogène en peptide C (et Caoguline) qui provoque une turbidité (figure 20). Le principe de cette technique est la mesure de la turbidité par photométrie. Deux méthodes sont utilisées, la méthode F mesure quantitativement la proportionnalité entre la concentration en endotoxines et la turbidité par transmission ou absorbance (turbidité en point final) et la méthode C mesure le temps nécessaire pour atteindre la transmittance ou l'absorbance dans le mélange ou de mesurer la vitesse d'apparition de la turbidité (turbidité cinétique).

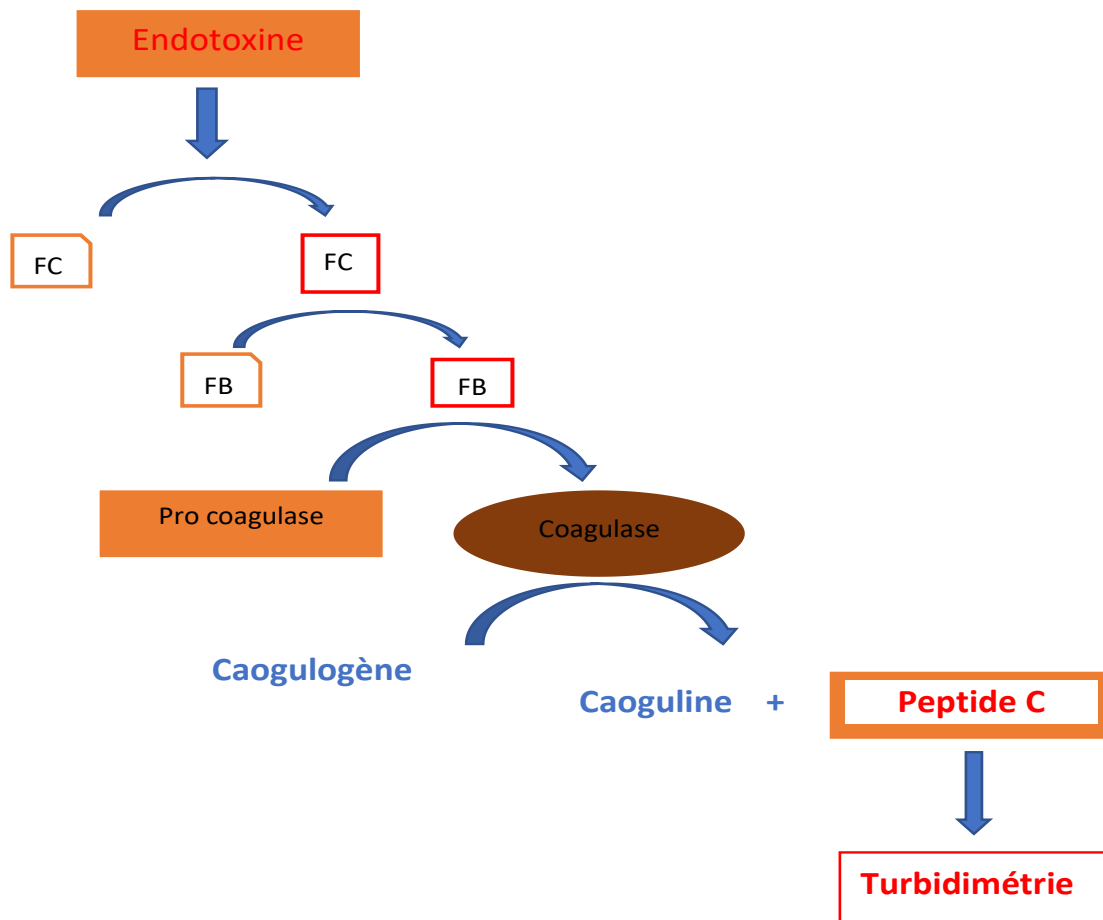


Figure 20: Réaction de turbidité induite par l'endotoxine

Lors de la réaction entre l'endotoxine et le lysat d'amœbocytes, on apporte un substrat chromogène. L'activation du facteur C aboutie à l'activation de la coagulase qui transforme le substrat chromogène en chromophore (pNA = p-nitroalanine) et peptide (figure 21). La libération de la pNA entraîne une coloration jaune qui est mesurée en continu tout au long de l'incubation.

Le principe de la technique est de mesurer cette coloration par l'une de ces 2 méthodes. La méthode E (calorimétrie en point final) mesure quantitativement la proportionnalité entre la concentration en endotoxines et la quantité de chromophores libérées et la méthode D (calorimétrie cinétique) mesure le temps nécessaire pour atteindre l'absorbance prédéfinie dans le mélange ou de mesurer la vitesse d'apparition de la coloration. Plus la concentration en endotoxines est importante plus la coloration (la libération de pNA) se fait rapidement.

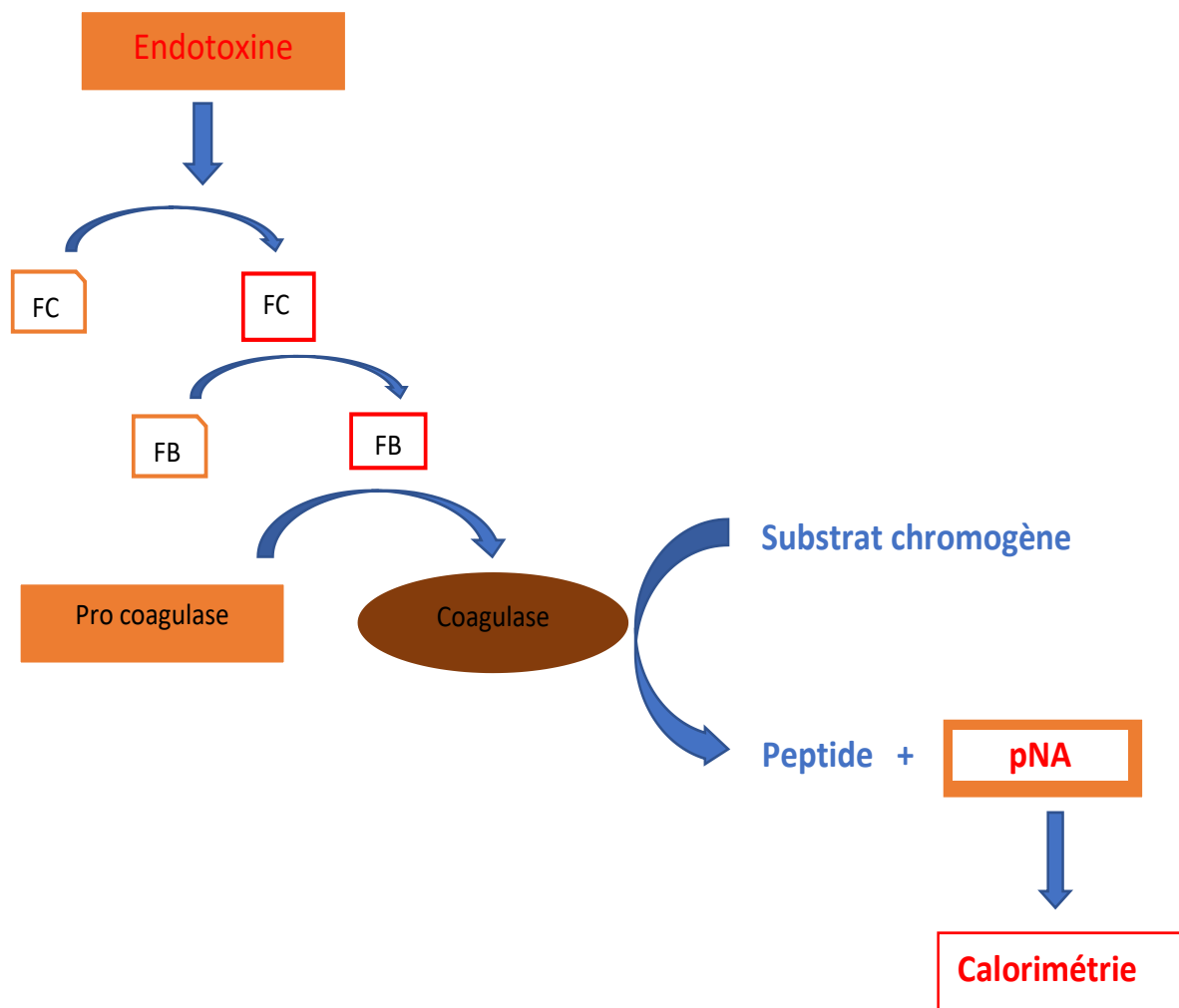


Figure 21: Réaction calorimétrique induite par l'endotoxine

Après avoir validé les contrôles préliminaires, les solutions sont préparées comme dans la recherche d'interférence : la solution 1 contient l'échantillon à analyser dilué dans de l'eau EEB, la solution 2 contient l'échantillon à analyser à la même dilution que dans 1 en y ajoutant une concentration en endotoxine équivalente à la médiane de la courbe d'étalonnage. La solution 3 est répliquée en 3 solutions de concentrations en endotoxines différentes, mais comprises dans l'intervalle indiqué par le fabricant du lysat, et la solution 4 est de l'eau EEB.

La lecture des solutions par spectrophotométrie permet de quantifier les endotoxines soit par les méthodes par point finale mesurant la proportionnalité entre la concentration en endotoxines et la quantité de chromophores libérées (méthode E) ou la turbidité (méthode C), soit par les méthodes cinétiques mesurant la vitesse ou le temps d'apparition de la coloration (méthode D) ou la turbidité (méthodes F).

Les solutions 3 permettent de tracer la courbe d'étalonnage, la solution 4 est témoin négatif, une fois les critères de validité de la courbe validés, les valeurs de l'absorbance des solutions 1, 2 et 4 sont reportées sur la courbe pour trouver les concentrations correspondantes. La concentration en endotoxines ajoutée est calculée en soustrayant la moyenne des concentrations obtenues avec les solutions 1 à la moyenne des concentrations obtenues avec les solutions 2.

Validité de l'essai

L'essai est valide sous 3 conditions :

Les contrôles préliminaires satisfont à l'essai : les critères de validité de courbe d'étalonnage et recherche d'interférences satisfont à l'essai.

La concentration en endotoxines ajoutée calculée est comprise entre [50% et 200%] de la concentration en endotoxines réelle ajoutée.

Les résultats avec la solution 4 sont inférieurs à la limite de détection ou ne sont pas supérieurs à limite du blanc pour le lysat utilisé.

Interprétation

Après correction de la dilution, si la moyenne des concentrations en endotoxines des solutions 1 est inférieure à la limite spécifiée en endotoxines, l'échantillon à examiner satisfait à l'essai.

Ces méthodes quantitatives ont aussi des limites, notamment l'utilisation des limules. Pour s'affranchir de l'utilisation de limule, de nouveaux tests peuvent être utilisés comme le facteur C recombinant ou l'essai d'activation des monocytes.

V. Nouveaux tests

V.1.1 Le facteur C recombinant

L'essai d'endotoxine bactérienne par le facteur C recombinant permet de quantifier les endotoxines par la méthode fluorimétrie quantitative. Lors de la réaction des amœbocytes induite par les endotoxines, le substrat fluorogénique apporté est clivé par le facteur C recombinant activé en un produit fluorescent et la fluorescence émise est mesurée (figure 22). La technique est autorisée par la pharmacopée Européenne depuis 2016, elle utilise des micros-plaques avec des puits pré-remplis de FCr à des quantités standard et avec des contrôles positifs du produit. Des kits d'essai par le facteur Cr sont disponibles chez différents laboratoires Lonza (PyroGene™) and Hyglos (EndoZyme® and EndoLISA®) avec une sensibilité et un temps de manipulation assez similaires.

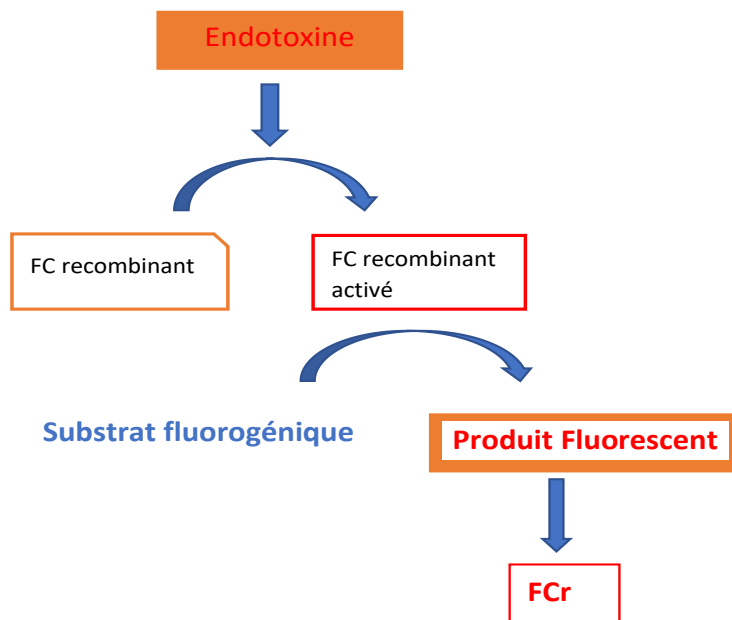


Figure 22: réaction fluorescente induite par les endotoxines en présence d'un substrat fluorogénique

L'essai endotoxines par le facteur C recombinant mesure ainsi la proportionnalité entre la concentration en endotoxines et la fluorescence émise pendant une période d'incubation : c'est la fluorimétrie en point final. Cette mesure est exprimée en RFU (RFU : unité de fluorescence relative). La fluorescence émise est calculée par la formule suivante : $\Delta RFU = RFU_{\text{point final}} - RFU_0$ ($RFU_{\text{point final}}$ = fluorescence du mélange réactif à la fin d'incubation et RFU_0 = fluorescence du mélange réactif en début de réaction).

Le facteur C recombinant utilisé est basé sur la séquence génomique de *Limulus polyphemus*, *Tachypleus tridentatus*, *Tachypleus gigas* ou *Carcinoscorpus rotundicauda*.

L'essai est décrit par la pharmacopée Européenne dans le chapitre 2.6.32.

Préparation de l'essai

Les équipements pouvant résister à la chaleur sont dépyrogénés à 250°C pendant 30 min et ceux en plastique, l'absence d'endotoxines détectables et d'interférences doivent être prouvée.

Les réactifs, le substrat fluorogène et le tampon doivent être exempts d'endotoxines détectables. Les réactifs sont mis en solution comme indiqué par le fabricant du kit dans de l'eau EEB ou toute eau produite par un autre procédé, mais qui ne réagit pas avec le réactif.

La solution mère d'étalon d'endotoxine est préparée en suivant les instructions du fabricant du kit. Elle est étalonnée par rapport à l'étalon international. La teneur en endotoxines est exprimée en unité internationale (UI).

L'échantillon à examiner est mis en solution par dissolution ou par dilution dans l'eau EEB ou dans une autre eau plus adaptée si nécessaire. Le pH de la solution peut être adapté en ajoutant un acide, une base ou un tampon de telle sorte à être dans l'intervalle de pH défini par le fabricant du kit (souvent entre 6 et 8).

La dilution maximale est déterminée comme d'écrit dans les essais d'endotoxines par les méthodes A, B, C, D et E par la formule $DMS = L.E.C / \lambda$, L.E.C est la limite en endotoxines d'une substance administrée par voie parentérale. $L.E.C = K / M$

K : dose en endotoxine en UI d'endotoxine par poids corporel et par heure que l'on peut administrer à un patient par voie parentérale sans effet toxique.

M : la dose maximale recommandée pour le produit en bolus par Kg de masse corporelle. Si le produit est en injections rapprochées ou perfusion continue M est la dose maximale par heure.

λ : la concentration la plus basse de la courbe d'étalonnage.

V.1.2 Contrôles préliminaires pour l'essai d'endotoxine par le FC recombinant

Des contrôles préliminaires sont à faire avant de réaliser l'essai. La vérification des critères de validité de la courbe d'étalonnage est réalisée pour chaque nouveau lot de facteur C recombinant et la recherche de facteurs d'interférences est faite à chaque essai. La validité de l'essai doit être vérifiée à chaque fois que des changements pouvant modifier les conditions de l'essai sont apportées.

- Vérification des critères de validité de la courbe d'étalonnage

Les solutions sont préparées de la même façon que pour la vérification des critères de validité de la courbe d'étalonnage des techniques chromogénique et photométrique. Trois solutions de concentration en endotoxines différentes, mais se situant dans un intervalle prédéfini par le fabricant du kit sont préparées à partir de solution étalon d'endotoxines. Si l'intervalle de concentration souhaité dépasse de 2 log₁₀ l'intervalle indiqué par le fabricant, des solutions supplémentaires encadrant chaque incrément logarithmique de l'intervalle couvert par la

courbe d'étalonnage sont préparées. Pour la réalisation de l'essai, chacune de ces 3 solutions est répliquée au moins en 3 exemplaires.

Les critères de la courbe d'étalonnage sont validés que si la valeur absolue du coefficient de corrélation de la droite est supérieure ou égale à 0.980 dans l'intervalle de concentration voulue.

- Recherche d'interférences

La recherche d'interférences est décrite comme pour les méthodes calorimétriques et chromogéniques (figure 19). Pour réaliser l'essai, 4 solutions de composition différente sont préparées. La solution 1 contient l'échantillon à examiner diluer dans de l'eau EEB, la solution 2 contient l'échantillon à examiner plus l'endotoxine à une concentration équivalente à la médiane de courbe d'étalonnage, la solution 3 est en 3 concentrations d'endotoxine différentes choisies dont la plus faible est égale à λ et la solution 4 est de l'eau EEB. Toutes les solutions sont dupliquées au moins en 2 exemplaires. La solution 2 est le témoin positif, la solution 3 permet de tracer la courbe d'étalonnage et la solution 4 est le témoin négatif. La fluorescence des tubes est mesurée, les valeurs obtenues sont reportées sur la courbe pour déterminer les concentrations correspondantes. La concentration moyenne en endotoxines ajoutée est calculée en soustrayant la concentration moyenne en endotoxines de la solution 1 à la moyenne des concentrations de la solution 2.

Validité de l'essai

La valeur absolue du coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage obtenu avec les solutions 3 est supérieure ou égale 0.980.

Le résultat de la solution 4 est inférieur à limite de détection du facteur Cr utilisé ou n'est pas supérieur à limite spécifiée pour le blanc dans la description du réactif utilisé.

Interprétation

Si la concentration calculée en endotoxines ajoutées est comprise entre 50% et 200% de la concentration connue en endotoxines ajoutée, l'échantillon à analyser ne contient pas de facteurs d'interférences.

Si la présence d'interférences est confirmée même si les dilutions sont augmentées, l'échantillon à analyser, peut-être traiter par filtration, neutralisation, par dialyse, chauffage ou par des étapes de capture spécifiques aux endotoxines. Ces procédés doivent être validés et la recherche d'interférences est refaite avec le même échantillon traité pour s'assurer qu'il n'y a pas eu de perte en endotoxines dû au traitement pour neutraliser les interférences.

Les solutions sont préparées comme pour la recherche d'interférences. La solution 3 permet de tracer la courbe d'étalonnage, et la solution 4 est le témoin positif. Les valeurs des mesures de la fluorescence des solutions 1 et 2 sont reportées sur la courbe d'étalonnage afin de déterminer leur concentration.

La concentration d'endotoxines ajoutées dans la solution 2 est calculée en soustrayant la moyenne des concentrations obtenues avec la solution 1 à la moyenne des concentrations obtenues avec la solution 2.

Validité de l'essai

Les critères de validité de la courbe d'étalonnage obtenue avec la solution 3 sont satisfaits.

La concentration calculée d'endotoxines ajoutée est comprise entre 50% et 200% de concentration réelle d'endotoxines ajoutées.

Le résultat obtenu avec la solution 4 est inférieur à limite de détection du FCr utilisé ou n'est pas supérieur, à la limite spécifiée pour le blanc dans la description du réactif utilisé.

Interprétation

Si la concentration moyenne en endotoxines de la solution 1, après correction de la dilution est inférieure à la limite spécifiée pour ce produit, l'échantillon à analyser satisfait à l'essai.

V.2 Essai d'activation des monocytes (MAT)

Le MAT est un essai *in-vitro* basé sur l'activation des monocytes humains par les pyrogènes entraînant une libération de cytokines pro-inflammatoires qui seront quantifiées par ELISA. Ces cytokines telles que l'interleukine 1 bêta (IL-1 β), l'interleukine 6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumoral (TNF α) entraîne une élévation de la température corporelle. Cette méthode permet donc de détecter la présence de pyrogènes dans les échantillons à analyser. Il est décrit comme méthode alternative (si validation spécifique) au test pyrogène chez le lapin par la pharmacopée Européenne depuis 2010 et pour la FAD comme méthode de substitut pour la détection des endotoxines bactériennes des médicaments parentéraux.

L'essai MAT est décrit par la pharmacopée Européenne chapitre 2.6.30 en 3 méthodes :

Méthode A : Essai quantitatif

Méthode B : Essai semi-quantitatif

Méthode C : Essai de comparaison à un lot de référence

Principe de l'essai

La solution à analyser est incubée avec des cellules mononuclées du sang périphérique (CMSP) humaines (obtenues par centrifugation du sang total périphérique humain héparinisé) ou une lignée de cellules monocytaires humaines. Les CMSP et la lignée de cellules monocytaires humaines sont placées dans un milieu de culture à une densité équivalente à $0.1-1 \times 10^6$ par contenant (puit, cellule, ...), additionnée du plasma du donneur ou du sérum AB. Le milieu de

culture est incubé à 37 °C dans un atmosphère contrôlé pendant une durée suffisante pour permettre l'accumulation du marqueur choisi (IL-1, IL-6, TNF α , pyrogène...). Les résultats obtenus du marqueur choisi avec l'échantillon à analyser sont comparés avec ceux obtenus avec l'étalon d'endotoxines ou le lot de référence de l'échantillon à analyser.

Avant d'effectuer l'essai, les sources des cellules monocytaires doivent être qualifiées et les contrôles préliminaires validés.

V.2.1 Qualification des sources de cellules monocytaires

Le sang total provient d'un seul donneur ou un mélange de dons et les CMSP sont isolées à partir de ce total chanté. Conformément à la médecine transfusionnelle, des marqueurs d'infection doivent être recherchés.

Qualification des donneurs de sang

Les donneurs doivent d'abord signer le consentement éclairé en termes de santé, sécurité et éthique. Ils doivent être en bonne santé, non atteint d'aucune infection (bactérienne ou virale) et ne présentent pas de symptôme d'infection depuis au moins une semaine avant le don. Ils ne doivent pas être sous traitement d'immunosuppresseur ou d'autres médicaments exerçant une influence sur le marqueur choisi pour l'essai. Ils ne doivent pas non plus avoir pris des anti-inflammatoires non-stéroïdiens dans les 48 h avant le don et des anti-inflammatoires stéroïdiens 7 jours avant le don.

Qualification des monocytes provenant d'un mélange de dons

Le mélange de sang ou de cellules (CMSP) est obtenu avec au moins 4 donneurs et de préférence 8. Le mélange est constitué de volume de sang approximativement identique ou des cellules provenant d'un volume approximativement identique de sang de chaque don. Pour qualifier les monocytes provenant d'un mélange de dons, la courbe dose-réponse du mélange avec l'étalon d'endotoxine est établie dans les 4 h suivant le prélèvement. Au moins 4 solutions diluées de concentration en endotoxines comprise dans l'intervalle 0.01 UI/mL à 4 UI/mL sont préparées pour tracer la courbe dose-réponse. La courbe dose-réponse doit satisfaire aux 2 critères de validité de la courbe d'étalonnage (voir partie V.2.2).

Qualification des monocytes cryoconservés

Le sang humain, les cellules CMSP ou la lignée de cellules monocytaires peuvent être cryoconservés. Les mélanges de cellules cryoconservées sont préparés juste avant congélation ou juste après décongélation de dons cryoconservés. La courbe dose réponse pour la qualification de sang ou de mélange de sang cryoconservés est établie immédiatement après décongélation. La courbe dose réponse obtenue doit satisfaire aux 2 critères de validité de la courbe d'étalonnage.

Lors des essais (méthode C) il faut tenir compte du fait que les cryoprotecteurs et leurs dérivés exercent une influence sur les cellules décongelées, à l'exemple le diméthylsulfoxyde (DMSO) est toxique pour les cellules en culture.

Qualification de lignées de cellules monocytaires

Une lignée de cellules monocytaires peut être cultivée pour assurer une production suffisante de cellules pour l'essai d'activation des monocytes et un clone de cette lignée peut être utilisé pour l'essai. Les cellules sont maintenues dans des conditions aseptiques, leurs identités et leurs stabilités sont vérifiées et le contrôle de contaminants mycoplasmatiques est fait régulièrement. Des critères de stabilité fonctionnelle de la lignée cellulaire doivent être établis pour permettre un suivi de ce dernier. Ces critères peuvent être des indicateurs de croissance, le signal lors de l'essai, l'expression des récepteurs. Des ligands spécifiques peuvent être utilisés pour tester l'expression des récepteurs, les lipopolysaccharides (LPS) pour TLR4 (Toll-Like Receptor 4), l'acide lipotéichoïque (LTA) pour TLR2, la lipoprotéine bactérienne de synthèse pour TLR2-TLR1.

Pour la qualification, la courbe dose réponse doit satisfaire aux 2 critères de validité de la courbe d'étalonnage (voir partie V.2.2).

V.2.2 Les contrôles préliminaires

Des contrôles préliminaires sont effectués afin de s'assurer de la validité et de la fidélité de l'essai. Les critères de validité de la courbe d'étalonnage établie avec l'étalon d'endotoxines doivent être vérifiés et satisfaire à l'essai. La recherche de facteurs d'interférences est faite à chaque fois que des modifications pouvant modifier les conditions de l'essai sont apportées. Il doit être vérifié que l'échantillon ne présente pas d'interférence dans les conditions de l'essai. Il faut aussi s'assurer que l'essai permet de détecter les endotoxines et aussi les pyrogènes non-endotoxiniques.

- Calcule de la concentration limite en contaminants (CLC)

La concentration limite en contaminant est un critère qui permet de valider la conformité/non-conformité de l'échantillon à analyser lors des essais. Elle est exprimée en équivalent endotoxine par mg, ml, ou en unité biologique de l'échantillon à analyser. Pour l'échantillon, si une concentration limite en endotoxines (LEC) est spécifiée, la concentration limite en contaminants prend la même valeur et s'exprime en équivalent endotoxine, elle est déterminée par la formule suivante $LEC = CLC = K/M$.

- Les critères de validités de la courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage est établie avec 4 solutions de concentration en endotoxines différentes qui sont ensuite dupliquées au moins en 4 exemplaires chacune. Le marqueur choisi est une des cytokines pro-inflammatoires induites par l'activation des monocytes par les pyrogènes (endotoxines et non-endotoxines). La concentration de base du marqueur choisi doit être la plus faible possible, elle doit être vérifiée et contrôlée dans le lot de cellules monocytaires utilisées pour le MAT. L'accumulation du marqueur choisi est mesurée pour chaque solution pendant un temps déterminé et les résultats permettent de tracer la courbe d'étalonnage.

Les critères de validité de l'essai sont satisfaits :

Si la régression des réponses en fonction du $\log_{10}$ dose est statistiquement significative ($p < 0,01$), et

Si la régression des réponses en fonction du $\log_{10}$ dose n'a pas d'écart de linéarité significatif ($p > 0,05$).

- Recherche de facteurs d'interférence

Lorsque c'est possible, la recherche de facteurs d'interférence s'effectue sur au moins 3 lots différents de la préparation à analyser. S'il existe une variabilité entre les lots rendant ainsi chaque lot unique, la recherche de facteurs d'interférences s'accompagne de la validation de la méthode, c'est une validation concomitante.

Si on ne dispose qu'un seul lot, les 3 essais s'effectuent sur ce même lot et la différence de réponse est tolérée à $\pm 50\%$.

L'échantillon à analyser est dilué avec des dilutions en progression géométrique sans dépasser la DMS. Chaque dilution de l'échantillon à analyser est dupliquée en 2 exemplaires et dans un exemplaire de chaque dilution, une quantité choisie en endotoxines γ est ajoutée. Cette quantité d'endotoxines ajoutée est égale à la médiane de la courbe d'étalonnage pour la méthode A et est égale à 2 fois la limite de détection (LD) pour la méthode B. La source de cellules monocytaires est ajoutée à toutes les solutions et l'accumulation du marqueur choisi est mesurée à une période déterminée. Les résultats sont reportés sur la courbe d'étalonnage pour ensuite calculer les concentrations en endotoxines dans toutes les solutions de la série de dilution exprimées en équivalent-endotoxine. La concentration moyenne en endotoxines ajoutées est calculée en soustrayant la concentration moyenne en équivalent-endotoxine obtenue des solutions seules (l'échantillon uniquement) de la concentration moyenne en équivalent-endotoxine des solutions avec endotoxine (échantillon + endotoxine ajoutée).

Pour les méthodes A et B, l'échantillon est exempt de facteurs d'interférence si la concentration moyenne en équivalent-endotoxine ajouté calculée est comprise entre 50% et 200% de la concentration en endotoxines ajoutées (médiane de la courbe d'étalonnage pour la méthode A et 2 LD pour la méthode B).

Si ce critère n'est pas satisfait avec les méthodes A et B, il est recommandé d'utiliser la méthode C pour effectuer le MAT.

- Recherche d'interférence avec le système de détection

La recherche d'interférence avec le système de détection utilisé pour le marqueur choisi s'effectue avec la dilution optimale de l'échantillon à analyser. Les résultats obtenus avec le marqueur choisi avec ou sans l'échantillon à analyser à la dilution optimale ne doit pas présenter d'écart supérieur à $\pm 20\%$ de la densité optique, par exemple si le système de détection est de l'ELISA.

- Contaminants non endotoxiniques : validation de la méthode

La méthode de MAT utilisé doit démontrer sa capacité à détecter les pyrogènes et pro-inflammatoires non endotoxiniques. L'essai peut se faire avec des lots du produit avérés contenir des contaminants non-endotoxiniques et ayant entraîné des réponses positives au test pyrogène chez le lapin ou des effets indésirables chez l'homme. Si ce type de lot n'existe pas pour le produit à tester, 2 ligands non-endotoxiniques des récepteurs TLR sont au moins utilisés pour valider la capacité de la méthode utilisée pour détecter les contaminants non-endotoxiniques. Ces ligands sont par exemple, peptidoglycanes, des acides lipoteichoïques, des lipoprotéines bactériennes de synthèse, de la flagelline, de l'extrait brut de cellules bactériennes entières. Pour effectuer l'essai, le choix des ligands à ajouter est conditionné par leur probabilité d'être un contaminant de la préparation à analyser et au moins, un des ligands est ajouté dans l'échantillon à analyser.

V.2.3 Méthodes

- Choix de la méthode

Les méthodes A, B et C ne peuvent être utilisées pour l'essai que si l'échantillon à analyser, a la capacité intrinsèque d'activer la libération de base du marqueur choisi ou possède une contamination par ce marqueur. Si ces méthodes devaient être utilisées pour ces cas-ci, le choix devrait être justifié et des mesures appropriées (ex : augmentation du nombre de donneur) seront mise en place afin d'augmenter la probabilité de détecter les lots contaminés avant l'essai. La méthode choisie est validée pour ce produit et doit inclure une mesure de la fréquence des non-réponses produit/contaminants .

La méthode A ne peut être utilisée si la courbe dose réponse établie avec les réponses des différentes dilutions de l'échantillon, n'est pas parallèle à la courbe d'étalonnage obtenue avec l'étalon d'endotoxines. Cependant, la méthode B qui est semi-quantitative pourrait être utilisée.

La méthode C est utilisée pour les cas où il existe une extrême variabilité des réponses des donneurs par rapport au couple échantillon/contaminants. Même si les monocytes de la majeure partie des donneurs ont des réponses similaires par rapport aux endotoxines, leurs réponses par rapport aux contaminants non-endotoxiniques peuvent varier (non-réponse, faible ou élevée).

- Remplacement de l'essai pyrogène chez le lapin par le MAT/méthode alternative.

Lorsque l'on dispose d'une préparation injectable suspectée de contenir un contaminant pyrogène, la monographie de la préparation spécifie un seul essai, soit un essai d'endotoxine bactérien ou un essai MAT. L'essai MAT est destiné à remplacer l'essai pyrogène chez le lapin, mais avant de le mettre dans une monographie, il faudra prouver que, au moins une des méthodes peut être appliquée au produit concerné et donne des résultats satisfaisants.

Les laboratoires doivent apporter les preuves d'applicabilité de la méthode MAT utilisée sur un produit concerné. Ces preuves doivent contenir le mode de préparation des échantillons, les mesures prises pour éliminer les facteurs d'interférences, ainsi que les données de l'essai pyrogène de lapin permettant d'appuyer le remplacement de l'essai d'endotoxine par le MAT.

Selon la prescription de la pharmacopée Européenne, l'essai MAT doit être fait sur tout nouveau produit suspecté de contenir des contaminants non-endotoxiques et destiné à être administré par voie parentérale.

V.2.3.1 Méthode A : essai quantitatif

Pour la méthode A, l'échantillon à analyser est comparé avec la courbe dose réponse obtenue avec l'étalon d'endotoxine.

- Conformité des sources de cellules monocytaires

Selon la source de cellules monocytaires certains critères sont à valider et ces critères sont valables pour les 3 méthodes (A, B et C)

Pour les cellules monocytaires qui proviennent de donneurs individuels, les cellules des 4 donneurs doivent satisfaire à l'essai avec l'échantillon à analyser, si l'essai est seulement satisfait par les cellules de 3 des donneurs, l'essai est refait avec des cellules de 4 nouveaux donneurs et au minimum les cellules de 7 des 8 donneurs satisfont à l'essai.

Si les cellules monocytaires proviennent de mélange de cellules de plusieurs donneurs, l'essai doit être satisfait avec l'échantillon à analyser pour, au moins un mélange de cellules.

Si la source cellulaire est une lignée de cellules monocytaires humaines, l'essai doit être satisfait avec l'échantillon à analyser pour un niveau de passage cellulaire qualifié.

- Réalisation

Pour réaliser l'essai avec la méthode A, l'échantillon est dilué au facteur de dilution le plus faible entraînant la stimulation maximale du marqueur choisi : c'est-à-dire le facteur dilution « f » utilisé pour la recherche d'interférence. Les solutions sont préparées comme suit : l'échantillon à cette dilution est la solution 1, la solution 2 est une dilution à $\frac{1}{2}$ de la solution 1 et la solution 3 la dilution à $\frac{1}{4}$ de solution 1, les solutions E (E1, E2 et E3) sont des solutions à la même dilution que les solutions 1, 2 et 3 respectivement, ajouté d'étalon d'endotoxine à concentration égale à la médiane de la courbe d'étalonnage. La solution 4 est le diluant apyrogène (ou sérum physiologique). La solution 5 contient le diluant apyrogène, elle est ensuite dupliquée en 4 solutions dont il est ajouté dans chacune une quantité d'endotoxine différente (Les mêmes concentrations utilisées pour les critères de validité de la courbe d'étalonnage voire VI.2.2) . Toutes les solutions sont dupliquées en 4 exemplaires et dans chaque solution, il est ajouté les cellules monocytaires d'un seul donneur, d'un mélange de dons ou d'une lignée de cellules monocytaires qualifiés et elles sont mises en culture pendant 4 h (figure 23).

La solution 4 est le témoin négatif et les solutions 5 permettent de tracer la courbe d'étalonnage.

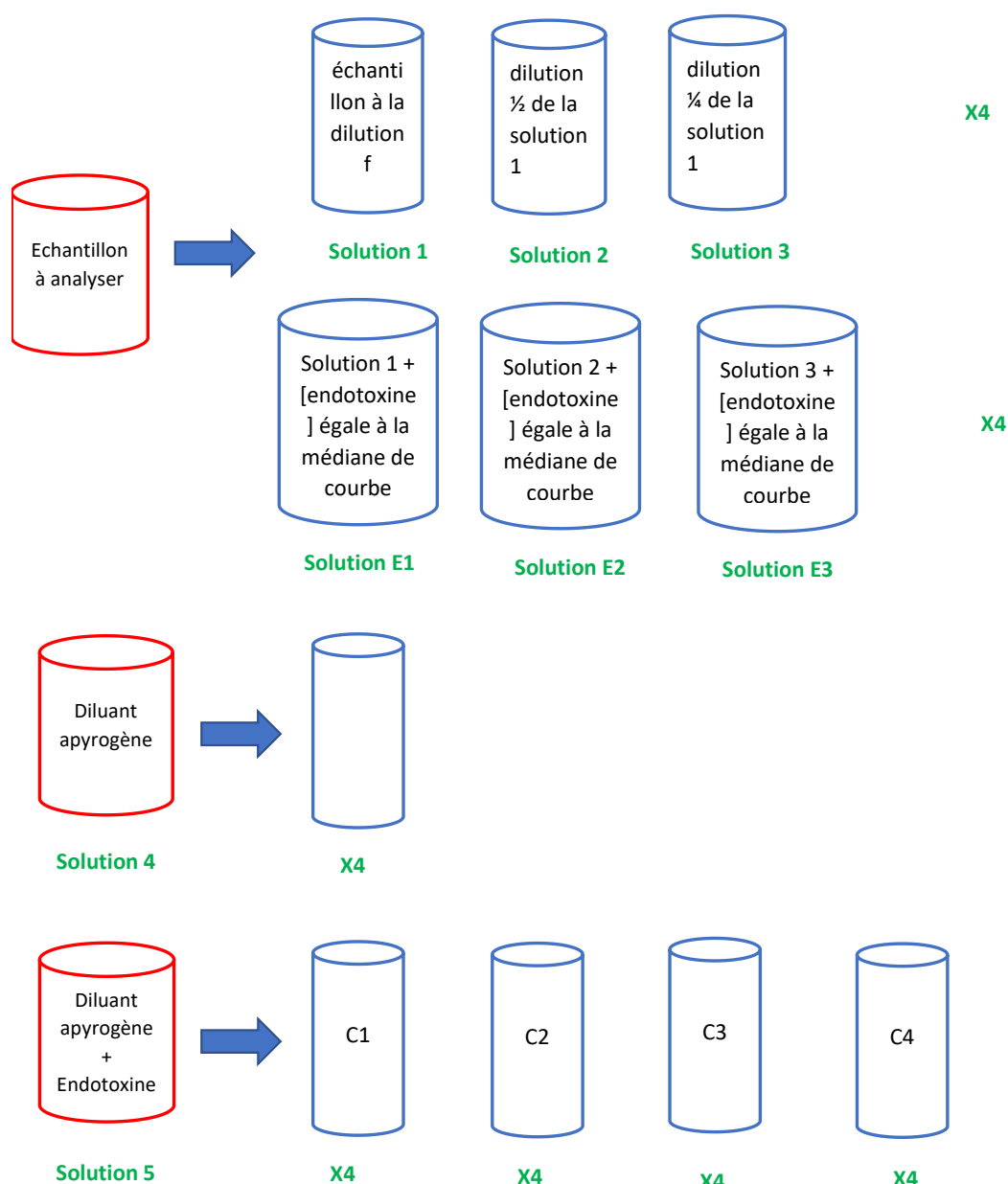


Figure 23: Préparation des solutions pour la méthode A de l'essai MAT

- Résultat

La courbe d'étalonnage obtenue avec les solutions 5 permet de calculer les concentrations en équivalent endotoxine des solutions 1, 2, 3, E1, E2 et E3. La concentration équivalent endotoxine ajoutée est calculée en soustrayant la moyenne des concentrations équivalent endotoxine des solutions 1, 2 et 3 respectivement à la moyenne des concentrations en équivalent endotoxine aux solutions E1, E2 et E3 et cette valeur doit être comprise entre 50% et 200% de la concentration en endotoxines réelles ajoutées. Les dilutions dont la concentration moyenne en endotoxines ajoutées calculée n'est pas comprise dans cet intervalle ne sont pas valides et sont exclues de l'essai.

Seuls les résultats obtenus avec les cellules qui ont satisfait aux critères de validité de la courbe d'étalonnage sont utilisés pour interpréter les résultats de l'essai.

- Validité

La concentration moyenne en équivalent endotoxine calculée doit être comprise entre 50% et 200% de la concentration réelle ajoutée. Seules les dilutions qui satisfont à l'essai seront retenues. Et au moins une des dilutions satisfait à l'essai

La préparation satisfait à l'essai si les concentrations moyennes obtenues avec les solutions 1,2 et 3 sont toutes inférieures au CLC (la concentration limite en contaminant) spécifiée pour le produit.

V.2.3.2 Méthode B : essai semi-quantitatif

La méthode B du MAT compare l'échantillon à analyser avec l'étalon d'endotoxine.

- Réalisation

Pour effectuer l'essai, plusieurs solutions de composition différentes sont préparées et chacune répliquée en 4 exemplaires (figure 24). Les solutions 1, 2 et 3 sont préparées comme pour la méthode A. Les solutions E1, E2 et E3 sont respectivement des répliques des solutions 1,2 et 3 dans lesquelles sont rajoutées une concentration en endotoxines équivalente à 2 fois la LD (limite de détection) estimée à la même valeur que pour la recherche de facteurs d'interférence. La solution 4 contient uniquement le diluant apyrogène (ou du sérum physiologique), les solutions 5, 6,7 et 8 sont composées du diluant apyrogène ajoutées d'endotoxine à des concentrations respectivement égales à 0.5 LD, 1LD, 2LD et 4LD. Les cellules monocytaires qualifiées sont ajoutées dans tous les exemplaires des solutions qui sont ensuite mises en culture pendant 4 h.

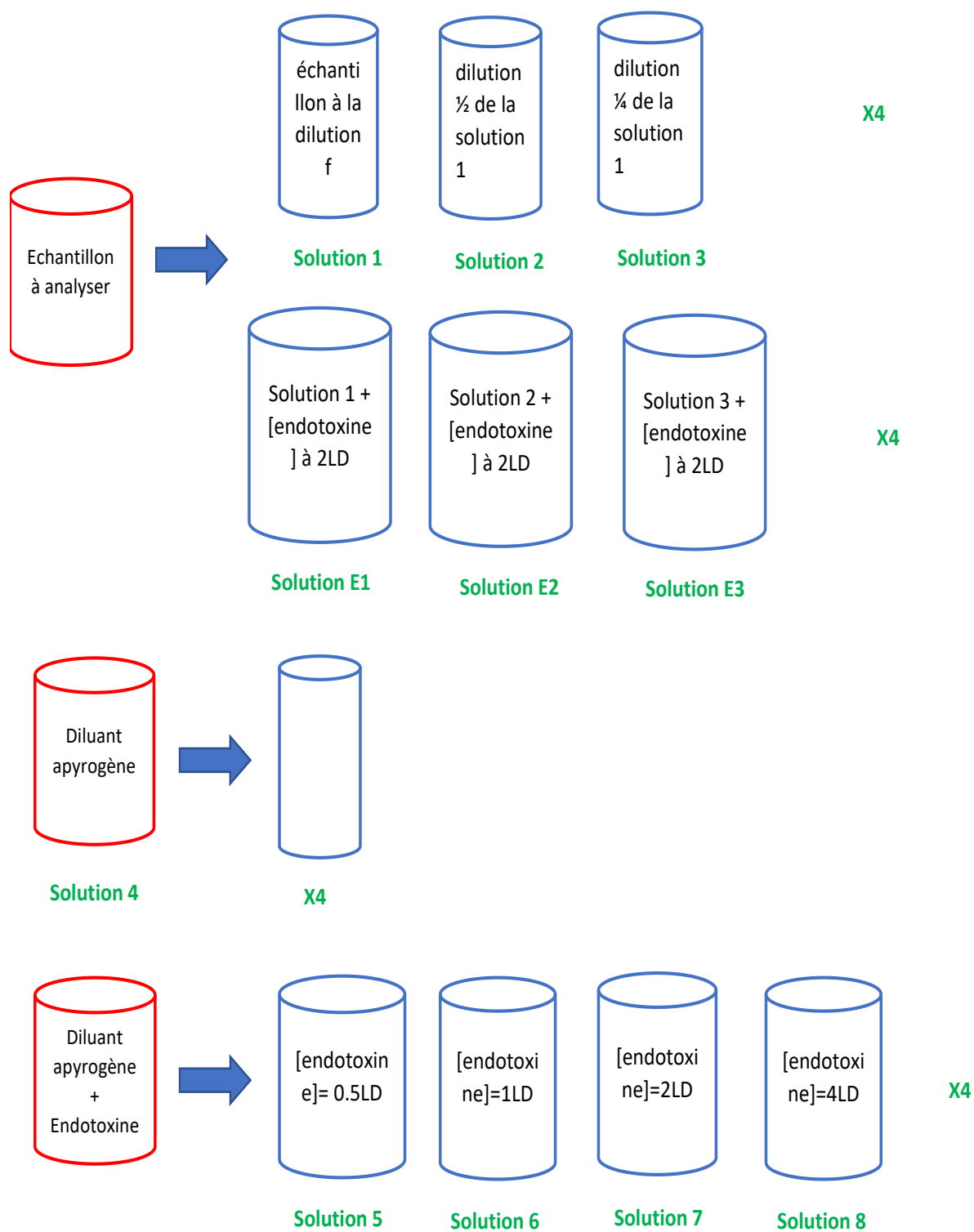


Figure 24: Préparation des solutions pour la méthode B de l'essai MAT

- Résultats

Seuls les résultats obtenus avec les cellules monocytaires entraînant des réponses progressivement augmentées de la solution 4 à la solution 8, sont pris en compte pour les calculs et interprétation. Certains critères de comparaison sont définis.

Les réponses obtenues avec les solutions 4 et 5 peuvent être identiques.

La réponse moyenne obtenue avec la solution 6 ([endotoxine]= 1LD) doit être supérieure à une valeur seuil choisi pour chaque source cellulaire. En dessous de ce seuil, les valeurs sont négatives et au-dessus, elles sont positives.

Si la réponse moyenne de la solution 5 ou 6 est supérieure au seuil choisi, la réponse de la solution 1 est considérée conforme. La conformité de chaque solution de l'échantillon à analyser est vérifiée en comparant leur réponse au seuil choisi. La solution est conforme si la réponse moyenne est au-dessous du seuil.

Pour chaque solution conforme de l'échantillon à analyser (1, 2 et 3), la réponse moyenne de la solution correspondante ajoutée d'endotoxine (E1, E2 et E3) est comparée à la réponse moyenne obtenue avec la solution 7 ([endotoxine]= 2LD) pour calculer la concentration moyenne en endotoxines ajoutées.

- Validité de l'essai

L'échantillon satisfait à l'essai, si les concentrations moyennes en contaminant obtenues avec les solutions 1, 2 et 3 sont toutes inférieures au CLC (la concentration limite en contaminants) spécifiée pour le produit.

V.2.3.3 Méthode C : essai de comparaison à un lot de référence

La méthode C consiste à comparer l'échantillon à analyser avec un lot de référence validé avec la même préparation. Cette méthode est utilisée lorsque la présence un contaminant n'est pas levée par les dilutions jusqu'à la DMS de l'échantillon ou lorsque celui-ci contient ou est suspecté de contenir des contaminants non-endotoxiniques. Lors de la réalisation de l'essai, l'intervalle de dilution doit contenir la dilution minimale (dilution permettant d'avoir la réponse maximale) car la décroissance de la réponse avec les dilutions peut être plus rapide pour les contaminants non-endotoxiniques par rapport aux endotoxines.

Pour chaque produit, le type analyse choisi pour la comparaison doit être justifié et validé et les critères de validité définis. Le choix du lot de référence doit être justifié selon des critères bien définis et autorisés.

- Réalisation de l'essai

L'essai s'effectue avec 3 dilutions de l'échantillon à analyser. La dilution qui permet d'avoir la réponse maximale du marqueur choisi est la dilution minimale de facteur de dilution « f » et 2 autres dilutions encadrent la dilution minimale de facteur $\frac{1}{2}$ sont utilisées pour l'essai. Ces dilutions doivent être validées, car la dilution f induisant la réponse maximale peut varier entre les donneurs et d'un lot à l'autre. Pour la validation des dilutions, au moins 3 essais sont effectués en utilisant pour chaque essai des cellules de donneurs différents. La dilution qui induit la réponse maximale du marqueur chez le maximum de donneurs dans les 3 essais et les 2 dilutions $\frac{1}{2}$ l'encadrant sont validées pour l'essai de comparaison avec le lot de référence.

Si l'échantillon non dilué induit la réponse maximale du marqueur choisi lors des essais de validation des dilutions, pour la suite de l'essai, l'échantillon à analyser et ces dilutions $\frac{1}{2}$ et $\frac{1}{4}$ sont utilisés. Les facteurs de dilutions sont nommés progressivement f1, f2 et f3.

Les solutions de l'essai sont préparées comme suit : 3 solutions 1, 2 et 3 du lot de référence aux facteurs de dilution f1, f2 et f3 respectivement et 3 solutions nommées 4, 5 et 6 de l'échantillon à analyser aux facteurs de dilution f1, f2 et f3 sont constituées pour la comparaison. Ensuite est préparée une solution témoin positif contenant l'étalon d'endotoxines à une concentration donnant une réponse positive claire est nommée 7 et une solution témoin négatif contenant uniquement le diluant, nommée 8 (figure 25).

Toutes les solutions sont dupliquées en 4 exemplaires et sont ensuite mises en culture pendant 4 h après ajout des cellules monocytaires qualifiées.

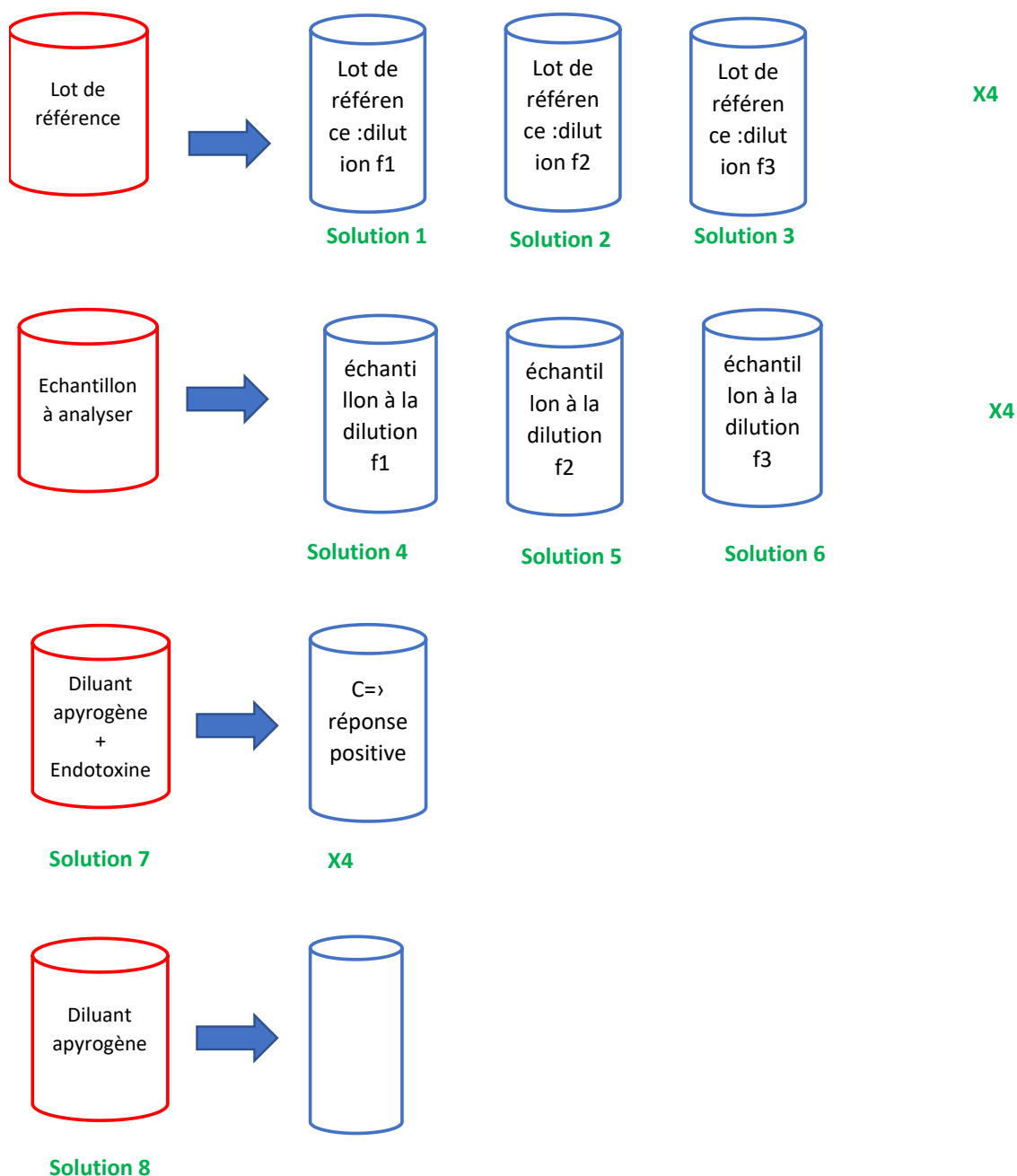


Figure 25: préparation des solutions pour la méthode C de l'essai MAT

- Résultat

Les résultats pris en compte sont ceux obtenus avec les cellules monocytaires qui ont donné une réponse positive supérieure à la réponse de base (solution 8) du marqueur choisi, avec la solution 7 (témoin positif) et au moins avec une des solutions du lot de référence (1, 2 et 3).

La courbe d'étalonnage du marqueur choisi est établie pour chaque source de cellules différentes et permet de calculer la réponse moyenne de chaque solution de l'essai. Ces résultats permettront de calculer la somme des réponses obtenues avec les solutions du lot de référence (1, 2 et 3) et la somme des réponses des solutions de l'échantillon à analyser (4, 5 et 6).

- Validité

L'échantillon satisfait à l'essai, si le rapport de la somme des réponses moyennes des solutions de l'échantillon et de la somme des réponses moyennes des solutions du lot de référence est conforme aux critères d'acceptation bien définis et sans dépasser une limite justifiée.

Les critères de conformité sont les mêmes définis dans la partie Méthode A.

V.3 Avantages et inconvénients des essais endotoxines

La technique de gélification est simple à mettre en place, elle est la méthode de référence de la pharmacopée Européenne. Mais la technique est manuelle et subjective, la formation de gel est qualifiée par le personnel qui doit être compétent et elle est aussi semi-quantitative.

Les techniques turbidimétriques et calorimétriques sont plus sensibles, la présence d'endotoxines même en faible quantité peut être détectée, et elles sont faciles à lire (turbidité ou coloration). Il y a moins d'interférences par rapport aux méthodes de gélification (A et B) et ils peuvent être automatisables. Cependant, le temps court d'incubation peut être un problème pour maintenir la température à 37°C, ce qui peut fausser le résultat. L'opérateur est toujours présent tout au long de l'essai pour remplir les plaques et noter les résultats. En plus la pêche intensive de limule fait que certaines espèces sont menacées (*Limulus polyphemus* et *Tachypleus tridentatus*). Ils sont en voie de disparition en Asie et protégées aux Etats-Unis.

L'essai du facteur Cr permet de s'affranchir des interférences avec les glycanes qui constituent un facteur d'interférence très fréquent avec les méthodes LAL (A, B, C, D et E). Il n'y a pas de variations biologiques liées aux limules. Cette méthode permet de s'affranchir de la pêche de limules. Mais l'essai ne peut être effectué qu'avec des échantillons liquides.

L'essai MAT permet de s'affranchir de l'essai pyrogène chez le lapin dans certaines conditions. Le MAT évalue la réponse immunitaire globale des cellules monocytaires permettant ainsi d'évaluer la pyrogénicité d'un mélange de pyrogène chez l'homme. Mais sa capacité de détecter les pyrogènes non-endotoxine est parfois remise en question.

Certains critères de comparaison des différentes méthodes d'essai d'endotoxine sont décrits dans le tableau 6.

Tableau 6: Comparaison des méthodes d'essai d'endotoxine

Essai	Test chez le Lapin	Gélification	Turbidité/ Calorimétrie	FCr	Essai d'activation des monocytes
Type de pyrogène	Tous	LPS	LPS	LPS	Tout
Facteurs d'interférence	—	B glucane	B glucane	—	—
Echantillon	Liquide/solide	Liquide uniquement	Liquide uniquement	Liquide/complexé	Liquide/solide

VI. Le risque chez le patient

VI.1 Physiopathologie

Lorsqu'une préparation injectable contenant une endotoxine bactérienne est injectée à un patient, la première réaction que l'on constate est une élévation de la température corporelle. Cette fièvre est due à une réaction inflammatoire induite par la réponse immunitaire innée. Cette réponse innée est initiée en première lieu pour défendre l'organisme contre les agents pathogènes. Cependant, les endotoxines bactériennes entraînent une suractivation de la réponse immunitaire innée, la réponse est exacerbée et inappropriée et aboutie à une sécrétion excessive de cytokines pro-inflammatoires telles que : IL-6, TNF α , IL-1 β , IL-18 etc. L'endotoxémie entraîne un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) qui se manifeste par des signes cliniques tels que l'hypotension, le dysfonctionnement ou la défaillance multiviscérale (débit cardiaque élevé, mauvaise oxygénation des tissus etc.), un syndrome de détresse respiratoire (SDRA) et une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). D'autre part, il a été démontré qu'une réponse anti-inflammatoire appelée tolérance à l'endotoxine (ET) est déclenchée en même temps que la réponse pro-inflammation lors de l'infection. Ainsi, les capacités de l'hôte pour combattre la septicémie sont d'autant plus compromises et insuffisantes. Lorsque cette réponse anti-inflammatoire est prolongée le risque d'aggravation de la septicémie et la mort est accru. Une fois que le choc septique s'installe, le taux de mortalité est estimé de 60 à 70% .

La septicémie affecte tous les systèmes d'organe, mais le cœur, les poumons, les reins, le système nerveux et le système de coagulation sont les plus touchés. Les signes cliniques pouvant affectés ces organes sont d'écrits dans le tableau 7.

Tableau 7: Expression clinique du dysfonctionnement des organes dans la septicémie

Organes	Expressions cliniques
Systèmes nerveux centrale (SNC)	Réduction de la vigilance, confusion, stupeur ou coma
Système cardiovasculaire	Diminution de la contractilité ventriculaire bilatérale, augmentation du débit cardiaque. Diminution de la résistance vasculaire systémique
Système de coagulation	Thrombocytopénie (souvent $<50\,000$ cellules mm^{-3}) Diminution des taux plasmatiques de fibrinogène et d'antithrombine III Augmentation des produits de dégradation du fibrinogène, allongement du temps de coagulation
Poumons	Hypoxémie qui nécessite souvent un soutien avec une ventilation mécanique Infiltrats bilatéraux répandus, inégaux ou homogènes dans les radiographies pulmonaires
Foie	Augmentation progressive des taux plasmatiques de bilirubine avec une augmentation modérée des taux plasmatiques de transaminases ; Extraction réduite des acides aminés avec synthèse réduite des protéines Augmentation de la libération hépatique de VLDL (lipoprotéine de très basse densité) avec une clairance réduite des triglycérides périphériques Altération de la libération de glucose qui entraîne souvent une hypoglycémie
Reins	Augmentation des taux plasmatiques de BUN (azote uréique sanguin) et de créatinine avec DFG (débit de filtration glomérulaire) réduit. Oligurie ou anurie

La voie de signalisation activée par les LPS

Une fois dans le sang, les LPS interagissent avec le système immunitaire de l'hôte par l'intermédiaire de son composant lipidique appelé lipide A. La majeure partie de l'activité biologique des LPS est attribuée au lipide A. Les LPS sont captés par les LPS-Binding Protein (LBP) qui vont les présenter aux Cluster of Differentiation 14 (CD14) situés à la surface des macrophages des leucocytes et des monocytes. Pour les autres cellules n'exprimant pas le CD14 à leur surface, les LPS se lient aux CD14 solubles pour les stimuler. Le complexe LPS-LBP-CD14 active le récepteur TLR4 (Toll-Like Receptor 4) lié à la Myeloid Differentiation protein 2 (MD2) et situé à la surface des cellules qui vont induire par la suite une cascade de signalisation à l'origine de la production de médiateurs pro-inflammatoires (figure 26).

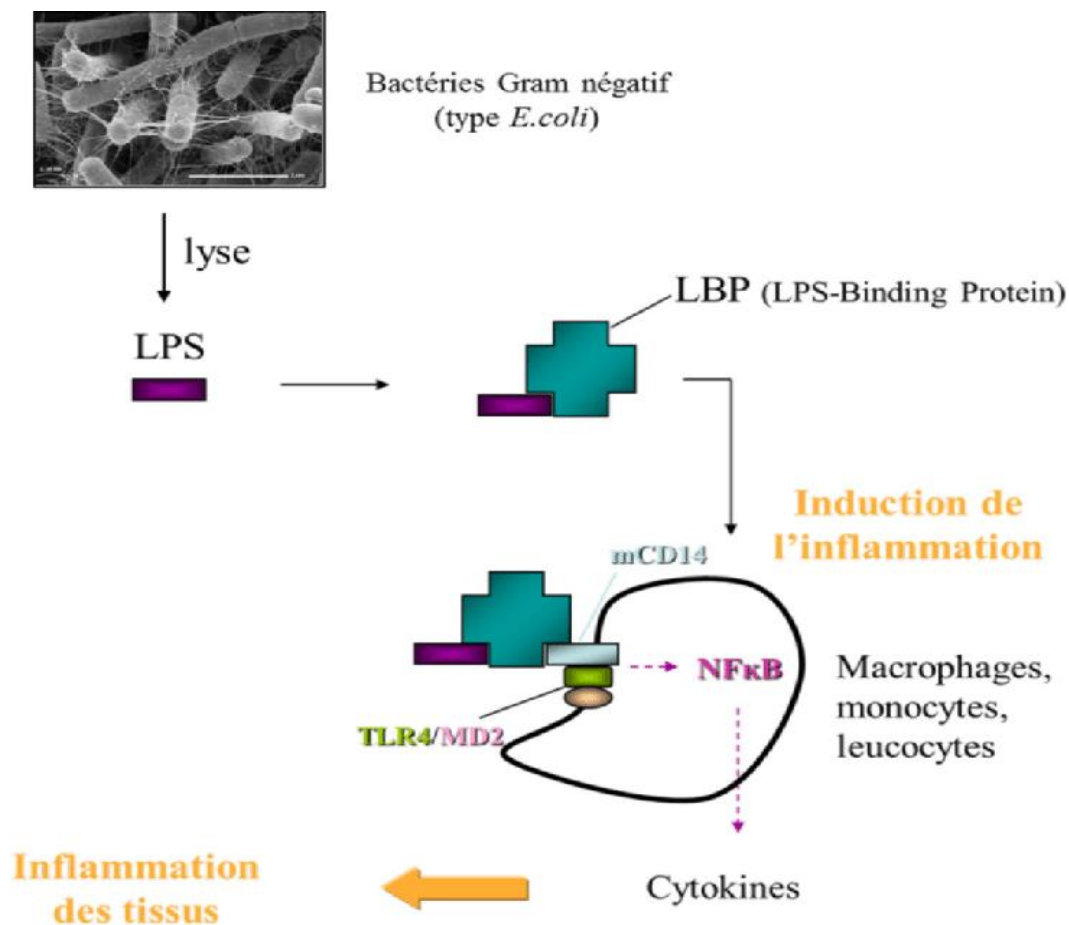


Figure 26: Cascade de réponse induite par les LPS www.researchgate.net

La lipopolysaccharide Binding Protein (LBP)

La LBP est une protéine synthétisée par le foie en majorité mais aussi par les tissus adipeux. Elle a une forte affinité avec les LPS d'où son nom, mais elle se lie aussi avec d'autres composants bactériens. Physiologiquement, la LBP est sécrétée chez le sujet sain à de faibles taux, mais en présence d'endotoxines (LPS) dans le sang, sa libération dans la circulation sanguine augmente considérablement et reste élevée environ 72h après l'intoxication.

Sa forte affinité avec le lipide A fait que même à l'ordre du picomètre, le lipide A peut induire une réponse immunitaire. La LBP entraîne une amplification de la réponse immunogène du LPS. Ce mécanisme est donc mis en place pour alerter l'organisme d'une infection afin de mettre en place une réponse immunitaire adoptée. Le rôle de la LBP dans ce mécanisme de défense est de présenter le LPS au co-récepteur CD14.

Le Cluster of differentiation 14 (CD14)

Le CD14 est un co-récepteur du TLR4 dans la cascade de signalisation induite par les LPS. C'est une protéine qui existe sous 2 formes, soluble et membranaire. La forme membranaire (m-CD14) exprimée à la surface des cellules immunitaires myéloïdes telles que les monocytes et les macrophages. La forme soluble (s-CD14) est sécrétée par les cellules endothéliales ou par clivage de la forme membranaire lorsqu'il y a un fort taux de LPS dans le sang et permet de stimuler les autres cellules ne possédant pas de m-CD14. Les 2 formes de CD14 ont la capacité de se lier au complexe LPS-LBP et de le présenter au TLR4 lié au MD2.

Il est à noter aussi que le CD14 peut reconnaître d'autres structures microbiennes outre que les LPS.

Toll Like Receptor 4 (TLR4)

Le TLR4 est exprimé aussi à la surface des cellules immunitaires myéloïdes. La découverte de son rôle dans la réponse immunitaire déclenchée par les LPS est récompensée du prix Nobel de physiologie en 2011 à ses auteurs Bruce BEUTLER et Jules HOFFMANN. Le TLR4 s'associe avec le MD2 puis va reconnaître le complexe LPS-LBP-CD14. Le TLR4 est ensuite activé en changeant de conformation et va induire une signalisation intracellulaire à l'origine de la sécrétion et de la libération dans le sang de cytokines pro inflammatoires (IL6, IL1 β , IL18, IL4, TNF α).

Myeloid Différenciation 2 (MD2)

C'est une glycoprotéine sécrétée qui se lie à la partie hydrophile du LPS et la partie extracellulaire du TLR4. L'interaction entre le MD2 et le LPS du complexe LPS-LBP-CD14 permet de relier ce dernier au LTR4 et d'induire son activation.

Outre la libération de cytokines pro-inflammatoires, une endotoxémie entraîne aussi la libération d'autres chimiokines, des protéines du complément (C3, récepteurs C3a et C5a), des thromboxanes, des prostaglandines (PGE, PGF, PGI₂), d'oxyde nitrique synthase (NOS) ou des catécholamines, qui vont agir comme des mécanismes alternatifs dans la réponse de l'organisme d'une présence bactérienne.

De ces mécanismes alternatifs, le rôle de l'oxyde nitrite (NO) dans l'induction de l'hypotension lors de l'endotoxémie est bien défini. La synthèse endogène de NO est principalement catalysée par les isozymes de NOS qui sont divisés en deux catégories. Les oxydes nitrites synthases constitutives (cNOS) et les inductibles (iNOS). Les cNOS sont régulés par la synthèse de calcium intracellulaire et se compose de deux isoformes, l'un est isolé dans les neurones (nNOS) et l'autre dans les cellules endothéliales (eNOS). Dans les conditions physiologiques, le NO libéré de manière constitutive par les cNOS, participe à la régulation du tonus vasculaire

basal, à l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et à l'inhibition de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium. Les iNOS sont indépendants du calcium et sont induits par des agents pro-inflammatoires (LPS, TNF α , IL-1 β) dans les macrophages, l'endothélium, les cellules musculaires lisses, les hépatocytes et les cardiomyocytes. Les iNOS sont à l'origine de la grande production de NO lors de l'endotoxémie. Le NO induit l'activation de la guanylyl cyclase soluble et l'augmentation consécutive des niveaux intracellulaires de guanosine monophosphate cyclique (cGMP). L'augmentation du cGMP entraîne une relaxation des muscles lisses vasculaires et une réduction de la réactivité aux vasoconstricteurs, contribuant ainsi au développement d'une hypotension réfractaire au cours de l'endotoxémie. Le NO a une action directe sur la ribonucléotide réductase (nécessaire à la synthèse de l'ADN) et sur plusieurs enzymes mitochondriales essentielles à la survie de la cellule. Le rôle du NO dans la physiopathologie de l'endotoxémie suggère que son inhibition pourrait améliorer l'état général des patients, ainsi des études sont menées dans ce sens.

Cependant, l'étendu et l'évolution de la réaction immunitaire face à l'endotoxémie va dépendre de la quantité d'endotoxines et de leur virulence, de la durée d'exposition et de l'aptitude du système immunitaire du malade face aux endotoxines.

La prise en charge des malades doit être précoce et c'est pour cela que le diagnostic de l'endotoxémie doit être fait le plutôt possible. La mesure de biomarqueurs d'endotoxémie permet de poser le diagnostic.

VI.2 Prise en charge de L'endotoxémie (Septicémie)

La prise en charge des patients sera tout d'abord détaillée de façon générale comme dans une suspicion de septicémie ensuite spécifiquement, le traitement anti-endotoxine sera traité.

La prise à charge du patient repose en premier sur le diagnostic précoce de l'endotoxémie, et la mise en place d'un traitement approprié et adapté à l'état générale du patient. L'endotoxémie peut rapidement évoluer vers un choc septique si la prise en charge n'est pas adaptée. Les critères comme le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) et la version rapide de l'évaluation séquentielle de la défaillance multiviscérale (q-SOFA) peuvent aider à poser le diagnostic précoce.

VI.3 L'évaluation de l'endotoxémie (septicémie)

Le SIRS, en raison d'une infection suspectée ou confirmée avec 2 des critères suivants, permet de définir une septicémie.

- Température inférieure à 36 °C ou supérieure à 38 °C
- Fréquence cardiaque supérieure à 90/minute
- Fréquence respiratoire supérieure à 20/minute, ou pression partielle artérielle de dioxyde de carbone inférieure à 32 mm Hg
- Nombre de globules blancs inférieur à $4 \times 10^9/L$ ou plus de $12 \times 10^9/L$, soit plus de 10 % de bandes.

D'autres scores peuvent être utilisés en parallèle.

Le SOFA est un système de notation des dysfonctionnements majeurs des organes. Il se base sur les niveaux d'oxygène, le nombre de plaquettes, le score de l'échelle de coma de Glasgow (évaluation des fonctions neurologiques centrales sur 3 critères : l'ouverture des yeux, la réponse motrice et la réponse verbale), le niveau de bilirubine et de créatinine et la pression artérielle moyenne. Ces informations sont lourdes à obtenir au chevet des patients ainsi le SOFA simplifié appelé q-SOFA est aujourd'hui utilisé pour le diagnostic.

Le q-SOFA se base sur 3 prédictions :

- Fréquence respiratoire d'au moins 22 respirations/minute
- Pression artérielle systolique 100 mm Hg ou moins
- Altération de l'état mental (score de l'échelle de coma de Glasgow < 15).

Un score de q-SOFA d'au moins égale à 2 et une infection suspectée ou avérée suggère l'instauration d'un traitement agressif et une admission en soin intensif. Les critères du score de q-SOFA sont faciles à obtenir en pratique clinique, mais repose sur la capacité du clinicien de détecter l'infection comme source des dysfonctionnements d'organe, ce qui n'est pas évident au début de l'infection.

Les critères de SIRS sont suggérés pour le diagnostic de la septicémie et le score q-SOFA peut être utilisé comme un outil de triage.

VI.4 Le traitement antimicrobien

Le traitement antibactérien doit être initié dans la première heure suivant la détection de septicémie et après avoir obtenu des échantillons pour la culture sans retarder la mise en place de l'antibiothérapie. Le retard dans la mise en place de l'antibiothérapie est associé à une augmentation de la mortalité. Initialement, l'antibiotique doit être à large spectre en couvrant tous les agents pathogènes, potentiellement impliqués. L'utilisation concomitante de plusieurs antibiotiques est à privilégier pour assurer une large couverture. Le choix des antibiotiques doit tenir compte des antibiotiques déjà utilisés, du site de l'infection et du profil microbien de l'environnement hospitalier. L'ajout d'antibiotique agissant sur les bactéries multirésistantes peut être nécessaire lorsqu'il y a une suspicion élevée de bactéries multirésistantes telles que *Pseudomonas* et *Acinetobacter*. Si une origine nosocomiale est suspectée des antibiotiques anti SARM (*Staphylocoque aureus* résistant à la méticilline) sont recommandés.

Un dosage adapté des antibiotiques est important, car leur efficacité dépend du taux sanguin maximal et de la durée de maintien du taux sanguin de l'antibiotiques au-dessus de la concentration minimale inhibitrice de l'agent pathogène. Ainsi, il sera plus approprié de débiter avec une dose de charge plus élevée pour atteindre un taux sanguin thérapeutique et par la suite ajouter des doses supplémentaires selon l'évolution de l'état général du patient.

Lors de la prise en charge générale d'une septicémie sans distinction d'endotoxémie, un traitement antifongique doit être envisagé, lors d'une suspicion clinique d'infection fongique. En cas de choc septique les échinocandines ou l'amphotéricine B liposomale doivent être introduits. Cependant, les antifongiques azolés ne sont appropriés que pour les patients hémodynamiquement stables.

La désescalade antimicrobienne doit être discutée quotidiennement et devrait être un élément important des visites quotidiennes, car les antibiotiques ne sont pas inoffensifs. Leur utilisation prolongée est associée à une résistance. La stratégie de désescalade devrait permettre de passer d'antibiotique de large spectre pour passer à un antibiotique de spectre plus étroit en fonction des profils de sensibilité. Un test nasal pour les SARM permet de réduire l'utilisation de la vancomycine et de linézolide. La désescalade peut être instaurée 7 à 10 jours pour la plupart des infections, mais elle peut être plus long si le contrôle à la source ne peut être réalisé, chez les immunodéprimés (et les infections fongiques).

VI.5 La réanimation fluide

La septicémie est associée à une vasodilatation, à une fuite capillaire et à une diminution du volume sanguin circulant efficace, réduisant ainsi le retour veineux entraînant une altération de la diffusion tissulaire et un dysfonctionnement d'organe. L'objectif de la réanimation est de corriger le volume intracellulaire, d'augmenter l'oxygénation tissulaire et d'inverser le dysfonctionnement des organes.

Un bolus cristalloïde de 30 mL/kg est recommandé dans les 3 heures suivant la détection d'une septicémie sévère. Cependant, l'administration de trop de liquide et notamment chez les patients avec une réserve cardiorespiratoire limitée pourrait entraîner des œdèmes pulmonaires, une insuffisance respiratoire hypoxémique et un risque accru de décès. Ainsi, la réanimation fluide est gérée selon les phases consécutives suivantes:

Sauver : au cours des premières minutes à quelques heures, des bolus fluides (un bolus fluide de 1 à 2 L de solution cristalloïde) sont nécessaires pour inverser l'hypoperfusion et le choc.

Optimisation : au cours de la deuxième phase, les avantages de l'administration de liquide supplémentaire pour améliorer le débit cardiaque et la perfusion tissulaire doivent être mis en balance avec les dommages potentiels.

Stabilisation : au cours de la troisième phase, généralement 24 à 48 heures après le début du choc septique, il convient d'essayer d'atteindre un bilan hydrique net neutre ou légèrement négatif.

Désescalade : la quatrième phase, marquée par la résolution des chocs et la récupération d'organes, devrait déclencher des stratégies agressives d'élimination des liquides.

Les solutions cristalloïdes (solution saline isotonique ou cristalloïdes équilibrés) sont recommandées pour la réanimation volumique en cas de septicémie et de choc septique. De plus en plus de preuves indiquent que les cristalloïdes équilibrés (solution de Ringer allaitée, Plasma-Lyte) sont associés à une faible incidence de lésions rénales, à moins de besoins de traitement de remplacement rénal et à une plus faible mortalité chez les patients gravement malades. La solution saline isotonique est associée à l'hyperchlorémie et à l'acidose métabolique.

La réanimation peut aussi être guidée par les taux de lactate. Une augmentation du lactate pendant la septicémie peut être due à une hypoxie tissulaire, à une glycolyse accélérée (état hyperadrénergique), à des médicaments (épinéphrine, agonistes bêta-2) ou à une insuffisance hépatique. La mesure du taux de lactate est un moyen d'évaluer la réponse à la réanimation, permet d'évaluer l'hypoperfusion des organes terminaux.

VI.6 Rétablissement de la pression artérielle

Après une réanimation liquidienne adéquate, une hypotension persistante et une hypoperfusion sont causées par la perte du tonus vasculaire sympathique normal qui va entraîner une vasodilatation, des déséquilibres neurohormonaux, une dépression myocardique et un dérèglement micro-circulatoire. L'utilisation des vasopresseurs et des inotropes permet de restaurer l'apport d'oxygène aux tissus en augmentant respectivement la pression artérielle et le débit cardiaque.

Lors de la réanimation la pression artérielle initiale cible recommandée est de 65 mm Hg. Un objectif plus élevé peut aider les patients souffrant d'hypertension chronique et une cible plus faible est bénéfique pour les patients présentant une fonction systolique réduite, les patients plus âgés et les patients atteints d'une maladie hépatique en phase terminale.

L'utilisation des vasopresseurs pour atteindre les objectifs de pression artérielle doit être évaluée par rapport aux risques pour le patient (arythmies, ischémies).

La noradrénaline a montré un bénéfice de survie avec un risque d'arythmie plus faible que la dopamine. Selon les recommandations par les lignes directrices de la campagne Surviving Sepsis, la noradrénaline est le vasopresseur recommandé pour atteindre les pressions artérielles cibles. Un autre médicament sympathomimétique comme la vasopressine ou l'épinéphrine peut être ajouté pour limiter les doses d'adrénaline. Quand les doses de noradrénaline dépassent 40 ou 50 µg/min, un autre vasopresseur est systématiquement ajouté. Lorsqu'il y a un dysfonctionnement cardiaque avec hypoperfusion persistante malgré un état volumique et une pression artérielle adéquats, il est recommandé d'ajouter de la dobutamine à la noradrénaline ou d'utiliser de l'épinéphrine seule.

L'épinéphrine est recommandée par les lignes directrices de la campagne Surviving Sepsis comme vasopresseur de deuxième intention. Il a une activité alpha-et bêta-adrénergique puissante, ce qui augmente la pression artérielle moyenne en augmentant le débit cardiaque et le tonus vasomoteur. Mais il est limité par un risque important de tachycardie, d'arythmie et d'acidose lactique transitoire.

Vasopressine. Le choc septique implique une carence relative en vasopressine. Il a été démontré que l'ajout de vasopressine comme hormone de remplacement a un effet d'épargne sur la noradrénaline, ce qui entraîne une dose plus faible nécessaire.

La phényléphrine est un agoniste alpha-adrénergique pur qui est couramment utilisé dans le choc septique. Son utilisation est limitée au choc septique compliqué par une tachyarythmie importante ou en complément d'un choc vasodilatateur réfractaire jusqu'à ce qu'il y ait plus de preuves de ses avantages.

L'angiotensine II a récemment été approuvée comme vasopresseur pour une utilisation en cas de choc septique. Il active les récepteurs de l'angiotensine de type 1a et 1b pour augmenter le calcium intracellulaire dans les muscles lisses, favorisant ainsi la vasoconstriction. Les données cliniques liées à son utilisation sont limitées à un essai récent qui a montré que l'ajout d'angiotensine II améliorait la pression artérielle chez les patients présentant un choc vasodilatateur réfractaire recevant des vasopresseurs à forte dose.

Les agents inotropes peuvent être nécessaires chez les patients présentant un débit cardiaque insuffisant après une réanimation liquidienne due à une cardiomyopathie induite par une septicémie ou à un choc combiné. Les données sont limitées, suggérant un agent inotrope optimal dans le choc septique, mais l'épinéphrine et la dobutamine sont les plus couramment utilisées. Une comparaison de la noradrénaline plus dobutamine par rapport à l'épinéphrine dans le choc septique n'a trouvé aucune différence dans la mortalité, les effets secondaires ou la durée du choc.

Les corticoïdes

S'il y a un besoin continu de vasopresseur, il est recommandé d'utiliser des corticoïdes en iv. Le corticostéroïde typique utilisé chez les adultes présentant un choc septique est l'hydrocortisone IV à une dose de 200 mg/jour administrée sous forme de 50 mg par voie intraveineuse toutes les 6 heures ou en perfusion continue. Il est introduit lorsque la dose de noradrénaline ou d'épinéphrine est supérieure à 0,25 mcg/kg/min au moins 4 heures après l'initiation.

Lors d'une septicémie l'utilisation d'antimicrobien adapté est essentielle pour la survie des patients. Mais lorsque la septicémie est d'origine endotoxinique l'antibiothérapie seul n'est pas suffisante, l'ajout d'un traitement anti-endotoxine pourrait considérablement améliorer la survie des patients.

VI.7 Traitement anti-endotoxine

Dans l'endotoxémie le syndrome de septicémie et de choc septique sont induits par les endotoxines (LPS) situées dans la membrane des bactéries à Gram négatives. Une bonne prise en charge de l'endotoxémie comprend un traitement antimicrobien approprié, des liquides et des électrolytes, un soutien nutritionnel, l'administration de vasopresseurs et une ventilation mécanique si nécessaire. Ces derniers sont définis par les mêmes modalités citées plus haut, mais en plus un traitement anti-endotoxine est bénéfique dans certains cas.

VI.7.1 Les anticorps monoclonaux anti-endotoxines

Les anticorps sont dirigés contre le lipide A des LPS, ce sont des immunoglobulines M (IgM). Deux anticorps anti-endotoxines ont fait l'objet d'étude clinique pour la prise en charge d'une endotoxémie. Il s'agit de l'IgM E5 qui est entièrement murin et de l'IgM HA-1A qui dérive d'une lignée cellulaire humaine et d'un petit fragment de protéine murin.

IgM E5 : est obtenu en immunisant des souris avec des cellules d'*Escherichia coli* 15 bouillies puis leurs cellules de la rate sont prélevées et fusionnées avec des cellules de myélome murin pour produire une seule lignée cellulaire qui produit un anticorps dirigé spécifiquement contre le lipide A. Il est administré par voie intraveineuse à une dose d'environ 2mg/kg et la dose peut être adaptée et répétée. Le produit est bien toléré avec peu d'effets indésirables. Des études ont démontré une amélioration de survie des patients avec une septicémie sans état de choc réfractaire.

IgM HA-1A : est un anticorps hybride humain-murin. Des études ont démontré une diminution de la mortalité dans le groupe recevant la dose de HA-1A, et est efficace chez les patients en état de choc réfractaire.

D'autres études ont été menées sur des anticorps bloquant les récepteurs des LPS, comme l'anticorps anti-récepteur TLR4. Il est capable d'inhiber la cascade de signalisation intracellulaire, réduisant ainsi la production de cytokines inflammatoires, et diminuait significativement la létalité associée au choc septique. Mais ces résultats sont du fait que la mortalité de ce modèle soit essentiellement liée par la présence d'une grande quantité d'endotoxine circulante.

Aujourd'hui l'utilisation des anticorps anti-lipide A et anti-récepteur des LPS est limitée avec des critères rigoureux de sélection des patients, car le rapport bénéfice coût est très faible. Le bénéfice que les anticorps apport à la prise en charge de l'endotoxémie n'est pas satisfaisant ainsi d'autres alternatives sont développées, comme l'épuration des endotoxines circulantes.

VI.7.2 Épuration extracorporelle de l'endotoxine circulante

De nombreuses approches visant à neutraliser les endotoxines ou de bloquer son interaction avec les récepteurs n'ont pas démontré une efficacité suffisante dans la prise en charge de l'endotoxémie. L'épuration extracorporelle est une approche permettant d'épurer seulement l'excès d'endotoxine dans le sang ce qui n'empêche pas la réaction inflammatoire primaire nécessaire pour un contrôle de l'infection. L'épuration de l'endotoxine circulante est réalisée sur une colonne similaire à celle utilisée pour l'hémodialyse ou l'hémodiafiltration, mais la polymyxine B est fixée sur la membrane de polystyrène. La polymyxine B (connue aussi sous le nom de colistine) est un antibiotique cationique cyclique liant l'endotoxine avec une haute affinité et permet d'absorber l'endotoxine circulante.

Pour l'épuration d'endotoxine, le sang est pompé au niveau veineux puis passe à travers la colonne et est ensuite réinjecté également au niveau veineux par un cathéter à double lumière de type cathéter de «dialyse». La durée d'hémoperfusion est de deux à trois heures et peut être répétée. Cette colonne (Toraymyxin®) est inventée par une firme japonaise (Toray).

Ce traitement est bien toléré et n'a aucun effet secondaire spécifique. Une étude menée en Italie a démontré une augmentation de la pression artérielle, un plus faible besoin en vasopresseurs et une récupération plus rapide des organes défaillants chez les patients soumis à l'épuration. Le mécanisme d'obtention des bénéfices n'est pas élucidé, mais il se peut que d'autres médiateurs en plus de l'endotoxine circulante soient épurés.

Plusieurs approches sont utilisées pour la prise en charge de l'endotoxémie, mais les résultats sont peu satisfaisants avec des coûts très élevés. Il n'y a pas un traitement spécifique, mais plutôt une approche globale individuelle en fonction de la clinique et la mise en place d'une thérapie précoce adaptée.

VII. Conclusion

Les préparations injectables sont des produits de santé qui doivent être stériles, apyrogènes et aparticulaires. Leur production s'effectue dans un environnement adapté avec un personnel formé et qualifié pour pouvoir fournir un niveau de qualité requis du produit. L'essai de stérilité permet de s'assurer de la stérilité, l'essai endotoxine de l'absence de pyrogène et le mirage pour vérifier l'absence de particule dans le produit fini. La stérilisation est réalisée pendant la production (répartition aseptique) ou sur le produit fini (stérilisation terminale). Mais la dépyrogénéation n'est réalisée que sur les articles en contact direct avec le produit (verrerie). Actuellement, il n'existe pas de méthode permettant de réaliser la dépyrogénéation sur le produit fini. Ainsi, l'assurance de l'absence de pyrogène repose essentiellement sur la qualité de production (environnement, équipement de protection, gestuelle,) et sur les essais d'endotoxines. L'endotoxine est un lipopolysaccharide de la membrane externe des bactéries Gram négatif, c'est un des pyrogènes les plus redoutés, car elle n'est pas éliminée par les méthodes de filtration stérilisante, elle résiste à des hautes températures et est très nocive même à l'état de trace. Dans le sang, les endotoxines peuvent entraîner une endotoxémie pouvant aboutir à un choc septique. Aujourd'hui, il n'existe pas un traitement spécifique contre l'endotoxémie, mais plutôt une prise en charge globale avec des agents antibiotiques adaptés, des vasopresseurs, une réanimation fluide et si l'état clinique le justifie l'ajoute d'un traitement anti-endotoxine. Plusieurs études sont menées sur les anticorps anti-lipide A et les anticorps anti-récepteur des LPS, mais les résultats sont peu satisfaisants pour des coûts de traitement très élevés. Une autre approche comme l'épuration extracorporelle de l'endotoxine circulante pourrait apporter une amélioration de la survie des patients. Ainsi le traitement spécifique de l'endotoxine est soumis à des critères rigoureux qui prennent en compte les traitements déjà instaurés, l'état clinique du patient et le bénéfice potentiel.

Bibliographie

1. 2019-guide-bpf-mai-2019-3.pdf [Internet]. [cité 21 sept 2022]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/uploads/2020/10/20/2019-guide-bpf-mai-2019-3.pdf>
2. Su W, Ding X. Methods of Endotoxin Detection. *SLAS Technol.* 1 août 2015;20(4):354-64.
3. Search results - European Pharmacopoeia 10.5 [Internet]. [cité 3 sept 2021]. Disponible sur: <https://pheur.edqm.eu/app/10-5/search?q=essai%20endotoxine%20>
4. Gillis C. Neutrophils in IgG- and endotoxin-induced systemic inflammation : protective or pathological agents ? [Internet] [phdthesis]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI; 2016 [cité 4 sept 2021]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01446484>
5. Zivot JB, Hoffman WD. Pathogenic effects of endotoxin. *New Horiz Baltim Md.* mai 1995;3(2):267-75.
6. Andre P. Exposition aux endotoxines : influence de l'alimentation et rôle dans le vieillissement cognitif [Internet] [These de doctorat]. Bordeaux; 2020 [cité 5 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2020BORD0177>
7. Lakshmikanth CL, Jacob SP, Kudva AK, Latchoumycandane C, Yashaswini PSM, Sumanth MS, et al. Escherichia coli Braun Lipoprotein (BLP) exhibits endotoxemia – like pathology in Swiss albino mice. *Sci Rep.* 4 oct 2016;6(1):34666.
8. Bodlet A, Mouthuy J, Pilette C. Une injection d'endotoxine bactérienne comme facteur déclenchant d'un asthme éosinophilique. *Rev Mal Respir.* 1 mars 2016;33(3):261-3.
9. Liu B, Jiang D, Ou Y, Hu Z, Jiang J, Lei X. An anti-inflammatory role of A20 zinc finger protein during trauma combined with endotoxin challenge. *J Surg Res.* 1 déc 2013;185(2):717-25.
10. López-Collazo E, del Fresno C. Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences. *Crit Care.* 14 nov 2013;17(6):242.
11. Fennrich S, Hennig U, Toliashvili L, Schlensak C, Wendel HP, Stoppelkamp S. Plus de 70 ans de détection de pyrogènes : état actuel et perspectives d'avenir. *Altern Lab Anim.* 1 juill 2016;44(3):239-53.
12. Perdomo-Morales R, Pardo-Ruiz Z, Spreitzer I, Lagarto A, Montag T. Monocyte activation test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of human serum albumin. *ALTEX.* 2011;28(3):227-35.
13. Corriveau CC, Danner RL. Antiendotoxin therapies for septic shock. *Infect Agents Dis.* févr 1993;2(1):44-52.
14. Marchant A, Bruyns C, Vandenabeele P, Abramowicz D, Gérard C, Delvaux A, et al. The protective role of interleukin-10 in endotoxin shock. *Prog Clin Biol Res.* 1994;388:417-23.
15. Diao H, Kohanawa M. Endogenous interleukin-6 plays a crucial protective role in streptococcal toxic shock syndrome via suppression of tumor necrosis factor alpha production. *Infect Immun.* juin 2005;73(6):3745-8.

16. DiPiro JT. Pathophysiology and treatment of gram-negative sepsis. Am J Hosp Pharm. nov 1990;47(11 Suppl 3):S6-10.
17. Bone RC. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. Clin Microbiol Rev. janv 1993;6(1):57-68.
18. Barriere SL, Guglielmo BJ. Gram-negative sepsis, the sepsis syndrome, and the role of antiendotoxin monoclonal antibodies. Clin Pharm. mars 1992;11(3):223-35.
19. Préparations parentérales - European Pharmacopoeia 10.5 [Internet]. [cité 13 déc 2021]. Disponible sur: [https://pheur.edqm.eu/app/10-5/content/10-5/0520F.htm?highlight=on&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration%20injectable&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration%20injectable&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration](https://pheur.edqm.eu/app/10-5/content/10-5/0520F.htm?highlight=on&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration%20injectable&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration%20injectable&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration&terms=pr%C3%A9paration)
20. Vetten MA, Yah CS, Singh T, Gulumian M. Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: Effects on structural stability and biomedical applications. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med. oct 2014;10(7):1391-9.
21. Zuo MY, Chen LJ, Jiang H, Tan L, Luo ZF, Wang YM. Detecting endotoxin with a flow cytometry-based magnetic aptasensor. Anal Biochem. déc 2014;466:38-43.
22. Kobayashi Y, Takahashi T, Shibata T, Ikeda S, Koshiba T, Mizumura H, et al. Factor B Is the Second Lipopolysaccharide-binding Protease Zymogen in the Horseshoe Crab Coagulation Cascade*. J Biol Chem. 31 juill 2015;290(31):19379-86.
23. article_scientifique_vague30_0pdf_articles_30pdf7.pdf [Internet]. [cité 20 déc 2021]. Disponible sur: https://www.a3p.org/wp-content/uploads/2010/09/article_scientifique_vague30_0pdf_articles_30pdf7.pdf
24. Lucas F, POPOFF M, Corthier G. Les entérotoxines bactériennes: structure, mode d'action. Ann Rech Vét. 1991;22(2):147-62.
25. Ding JL, Ho B. A new era in pyrogen testing. Trends Biotechnol. août 2001;19(8):277-81.
26. Classe Merostomata (Mérostomes) [Internet]. AquaPortail. [cité 24 janv 2022]. Disponible sur: <https://www.aquaportail.com/taxonomie-classe-34-merostomata.html>
27. Pyrotell-T_IFU_PN000845r6_fr.pdf [Internet]. [cité 8 févr 2022]. Disponible sur: https://www.acciusa.com/pdfs/accProduct/Pyrotell-T_multilang_IFUs/Pyrotell-T_IFU_PN000845r6_fr.pdf
28. biomerieux_cp_lancement_de_endozone_ii_go.pdf [Internet]. [cité 4 mars 2022]. Disponible sur: https://www.biomerieux.com/sites/corporate/files/news-event-press-release/biomerieux_cp_lancement_de_endozone_ii_go.pdf
29. Fennrich S, Hennig U, Toliashvili L, Schlensak C, Wendel HP, Stoppelkamp S. More than 70 Years of Pyrogen Detection: Current State and Future Perspectives. Altern Lab Anim. 1 juill 2016;44(3):239-53.

30. Silva VF, da Silva Guedes Junior D, da Silveira IA, Almeida AS, de Paiva Conte F, Delgado IF, et al. A Comparison of Pyrogen Detection Tests in the Quality Control of Meningococcal Conjugate Vaccines: The Applicability of the Monocyte Activation Test. *Altern Lab Anim.* 1 nov 2018;46(5):255-72.
31. Rispin A, Harbell JW, Klausner M, Jordan FT, Coecke S, Gupta K, et al. Quality Assurance for In Vitro Alternative Test Methods: Quality Control Issues in Test Kit Production. *Altern Lab Anim.* 1 janv 2004;32(1_suppl):725-9.
32. Gorman R. Atlantic Horseshoe Crabs and Endotoxin Testing: Perspectives on Alternatives, Sustainable Methods, and the 3Rs (Replacement, Reduction, and Refinement). *Front Mar Sci* [Internet]. 2020 [cité 7 mars 2022];7. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmars.2020.582132>
33. Liu PT, Schenk M, Walker VP, Dempsey PW, Kanchanapoomi M, Wheelwright M, et al. Convergence of IL-1 β and VDR Activation Pathways in Human TLR2/1-Induced Antimicrobial Responses. *PLOS ONE.* 5 juin 2009;4(6):e5810.
34. Watson R w. g., Redmond H r, Bouchier-Hayes D. Role of endotoxin in mononuclear phagocyte-mediated inflammatory responses. *J Leukoc Biol.* 1994;56(1):95-103.
35. Alothaimeen T, Trus E, Basta S, Gee K. Differential TLR7-mediated cytokine expression by R848 in M-CSF- versus GM-CSF-derived macrophages after LCMV infection. *J Gen Virol* [Internet]. 1 mars 2021 [cité 21 mars 2022];102(3). Disponible sur: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001541>
36. Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today.* mars 1999;5(3):123-32.
37. de Prost N, Razazi K, Brun-Buisson C. Unrevealing culture-negative severe sepsis. *Crit Care Lond Engl.* 26 sept 2013;17(5):1001.
38. Narayana Iyengar S, Dietvorst J, Ferrer-Vilanova A, Guirado G, Muñoz-Berbel X, Russom A. Toward Rapid Detection of Viable Bacteria in Whole Blood for Early Sepsis Diagnostics and Susceptibility Testing. *ACS Sens.* 24 sept 2021;6(9):3357-66.
39. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care Lond Engl.* 2006;10(5):233.
40. Zhu Z, Chambers S, Zeng Y, Bhatia M. Gases in Sepsis: Novel Mediators and Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci.* 27 mars 2022;23(7):3669.
41. Park SH, Kim ND, Jung JK, Lee CK, Han SB, Kim Y. Myeloid differentiation 2 as a therapeutic target of inflammatory disorders. *Pharmacol Ther.* mars 2012;133(3):291-8.
42. Barochia A, Solomon S, Cui X, Natanson C, Eichacker PQ. Eritoran tetrasodium (E5564) Treatment for Sepsis: Review of Preclinical and Clinical Studies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* avr 2011;7(4):479-94.
43. Duan G, Zhu J, Xu J, Liu Y. Targeting myeloid differentiation 2 for treatment of sepsis. *Front Biosci-Landmark.* 1 juin 2014;19(6):904-15.
44. Dupuy C. Approche globale de la validation de la stérilisation par autoclavage: optimisation et choix stratégiques. :103.

45. Rishi P, Bharrhan S, Bhalla MPS, Koul A, Chopra K. Inhibition of Endotoxin-Induced Hepatotoxicity by Melatonin in Rats. *Int J Biomed Sci IJBS*. juin 2008;4(2):103-12.
46. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med*. 2021;47(11):1181-247.
47. Dugar S, Choudhary C, Duggal A. Sepsis and septic shock: Guideline-based management. *Cleve Clin J Med*. 1 janv 2020;87(1):53-64.
48. Dell'Anna AM, Taccone FS. Early-goal directed therapy for septic shock: is it the end? *MINERVA Anesthesiol*. 2015;81(10):6.
49. Martí-Carvajal AJ, Solà I, Gluud C, Lathyris D, Anand V. Human recombinant protein C for severe sepsis and septic shock in adult and paediatric patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 12 déc 2012;2012(12):CD004388.
50. Miller RR, Dong L, Nelson NC, Brown SM, Kuttler KG, Probst DR, et al. Multicenter Implementation of a Severe Sepsis and Septic Shock Treatment Bundle. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 juill 2013;188(1):77-82.
51. score de Glasgow.pdf [Internet]. [cité 30 août 2022]. Disponible sur: <https://www.tousalecole.fr/sites/default/files/medias/integrascol/documents/score%20de%20Glasgow.pdf>
52. Li Y, Ji XJ, Jing DY, Huang ZH, Duan ML. Successful treatment of gastrointestinal infection-induced septic shock using the oXiris® hemofilter: A case report. *World J Clin Cases*. 26 sept 2021;9(27):8157-63.
53. Traitement du choc septique par épuration extracorporelle de l'endotoxine circulante [Internet]. *Revue Medicale Suisse*. [cité 12 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/revue-medicafe-suisse/2013/revue-medicafe-suisse-410/traitement-du-choc-septique-par-epuration-extracorporelle-de-l-endotoxine-circulante>

Résumé

Les préparations injectables sont des médicaments qui sont directement injectés dans la circulation sanguine, ce qui les rend potentiellement nocifs s'ils ne sont pas de bonne qualité. Lors de la fabrication de médicaments injectables, le personnel, l'environnement de production et les matières premières sont régis par des normes permettant d'assurer leur qualité et leur innocuité. Des contrôles sont aussi effectués sur le produit fini, tel que l'essai de stérilité et l'essai d'endotoxine afin de s'assurer d'absence d'éventuelle contamination et s'il y en a, de mettre en place des mesures nécessaires pour une décision de libérer ou non le lot. L'essai endotoxine est particulièrement important pour les préparations injectables. Ces essais sont décrits dans la pharmacopée Européenne et le choix de la méthode doit être adapté au produit. L'endotoxine est un lipopolysaccharide (LPS) présent dans la membrane externe des bactéries Gram négatives. Les endotoxines injectées même à l'état de trace peuvent causer des complications graves chez le patient, ce sont des pyrogènes qui entraînent une élévation de la température et déclenchent une réaction inflammatoire inappropriée pouvant entraîner une endotoxémie chez le patient. L'endotoxémie est induite par la présence d'endotoxine dans le sang et sa prise en charge est complexe. Il n'existe pas un traitement spécifique à l'endotoxémie, mais plutôt une approche globale de prise en charge d'une septicémie. La prise en charge doit être précoce avec un antibactérien adapté, une supplémentation en fluide, des vasopresseurs pour hypotension et une ventilation si nécessaire. Cependant les anti-endotoxines tels que les anticorps monoclonaux pourraient être utilisés, mais ils n'ont pas démontré une efficacité suffisante et le coût de la thérapie est élevé. L'épuration extracorporelle de l'endotoxine circulante pourrait apporter de meilleurs résultats de survie, mais elle est aussi très chère.

Mots clés : Endotoxine bactérienne, préparation injectable, essai d'endotoxine, essai de stérilité, endotoxémie, anti-endotoxine.

SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances,

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

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité,

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession,

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens, De coopérer avec les autres professionnels de santé.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

Résumé

Les préparations injectables sont des médicaments qui sont directement injectés dans la circulation sanguine, ce qui les rend potentiellement nocifs s'ils ne sont pas de bonne qualité. Lors de la fabrication de médicaments injectables, le personnel, l'environnement de production et les matières premières sont régis par des normes permettant d'assurer leur qualité et leur innocuité. Des contrôles sont aussi effectués sur le produit fini, tel que l'essai de stérilité et l'essai d'endotoxine afin de s'assurer d'absence d'éventuelle contamination et s'il y en a, de mettre en place des mesures nécessaires pour une décision de libérer ou non le lot. L'essai endotoxine est particulièrement important pour les préparations injectables. Ces essais sont décrits dans la pharmacopée Européenne et le choix de la méthode doit être adapté au produit. L'endotoxine est un lipopolysaccharide (LPS) présent dans la membrane externe des bactéries Gram négatives. Les endotoxines injectées même à l'état de trace peuvent causer des complications graves chez le patient, ce sont des pyrogènes qui entraînent une élévation de la température et déclenchent une réaction inflammatoire inappropriée pouvant entraîner une endotoxémie chez le patient. L'endotoxémie est induite par la présence d'endotoxine dans le sang et sa prise en charge est complexe. Il n'existe pas un traitement spécifique à l'endotoxémie, mais plutôt une approche globale de prise en charge d'une septicémie. La prise en charge doit être précoce avec un antibactérien adapté, une supplémentation en fluide, des vasopresseurs pour hypotension et une ventilation si nécessaire. Cependant les anti-endotoxines tels que les anticorps monoclonaux pourraient être utilisés, mais ils n'ont pas démontré une efficacité suffisante et le coût de la thérapie est élevé. L'épuration extracorporelle de l'endotoxine circulante pourrait apporter de meilleurs résultats de survie, mais elle est aussi très chère.

Mots clés : Endotoxine bactérienne, préparation injectable, essai d'endotoxine, essai de stérilité, endotoxémie, anti-endotoxine.