

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2020

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Présenté par :

HANED Sara

Thème

Contrôle de qualité du sérum antidiphthérique d'origine équine.

Soutenu le : 08 /09 / 2020

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>M. MAHDJOUB Mohamed Malik</i>	<i>MCB.</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>Mme DJENADI Katia</i>	<i>MAB.</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mme YALAOUI-GUELLAL Drifa</i>	<i>MCB.</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promotrice</i>
<i>M. KEZZAL Salim</i>	<i>Pharmacien.</i>	<i>Institut Pasteur d'Alger</i>	<i>Invité</i>

Année Universitaire : 2019/2020



Remerciements

Je remercie, en premier lieu ALLAH pour m'avoir donné la force, la patience et la résolution pour réaliser ce travail.

A ma promotrice : Chère Mme YALAOUI-GUELLAL Drifa

J'adresse ces quelques mots, à la femme extraordinaire, bienveillante et généreuse que vous êtes. Croyez moi que ces mots ne vous définisse pas dans votre plénitude. Je vous remercie énormément de m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail, sans ne jamais épargner aucun effort pour me guider dans le chemin sinueux de la recherche. Sans votre clairvoyance, votre disponibilité et vos corrections méticuleuses, ce travail n'aurait pu être rendu dans le juste délai

Mes vifs remerciements à M. MAHDJOUR Mohamed Malik qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie également l'examinatrice Mme DJENADI Katia pour l'effort et l'attention consentis à l'égard de ce modeste travail.

Je tiens aussi à remercier l'équipe ayant eu en charge mon stage au sein de l'institut pasteur d'Alger.

Dédicaces

Ames parents

Vous êtes mon plus beau cadeau du monde. Merci d'être là pour moi, de m'avoir soutenu et d'avoir cru en moi tout au long de ces années d'études. Sans vous rien n'aurait été possible.

A ma sœur

Entre fou-rire, complicité et bêtises, tu as toujours été là pour moi. Sache que ta grande sœur est derrière toi à tout jamais.

A ma mami

Merci pour tout les « Douaa » que tu fais pour moi, tu es notre pilier. Que Dieu de garde pour nous.

A mes tantes et à mes oncles

Je suis la nièce la plus chanceuse sur terre rien que de vous avoir. Merci de me combler d'encouragements et bienveillance.

A ma cousine et mes cousins

Merci pour toute votre bonne humeur, ainsi que votre joie de vivre que vous m'apportez au quotidien. Vous êtes extraordinaire.

Sava

A ma meilleure amie

Ça fait déjà plusieurs années qu'on se connaît, on s'est éloigné certes, mais cela n'a rien changé entre nous. Tu es et tu resteras ma meilleure confidente.

A tous mes très chers amis

*J'ai passés des années inoubliables avec vous. Mille merci pour votre soutien et votre présence dans ma vie, que les liens qui nous unissent subsistent à jamais à vous «**Sarah, Houcine, Thelili, Manel, Slimane**» le temps qu'on a passé ensemble restera toujours dans mon cœur. Ainsi qu'à **Yacine Maiz**, je te remercie pour tout le soutien et l'aide que tu m'as apportée.*

*A ma superbe promo **Biotechnologie Microbienne**, on a passé de merveilleux moments ensembles, que de beaux souvenirs, vous êtes et vous resterez graver dans ma mémoire à jamais.*

Longue vie à vous !

Saba

Table des matières

Dédicaces

Liste des tableaux

Listes des figures

Listes d'abréviations

Introduction.....01

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralité sur La diphtérie03

I.1. La diphtérie.....03

I. 1. 1. Définition de la diphtérie.....03

I. 1. 2. Historique.....03

I. 1. 3. Epidémiologie.....04

I. 1. 4. Les symptômes de la diphtérie.....06

I. 1. 5. Traitement de la diphtérie.....08

I.2. *Corynebacterium diphtheriae* ou bacilles de Klebs et Loeffler.....08

I. 2. 1. Classification.....09

I. 2. 2. Taxonomie et Habitat.....09

I. 2. 3. Culture.....10

I. 2. 4. Facteurs de pathogénicité.....11

I. 2. 4. 1. Les principaux antigènes.....11

I. 2. 4. 2. Les pili et les fimbriae.....12

I. 2. 4. 3. Les adhésines.....12

I. 3. La toxine diphtérique12

I. 3. 1. Définition de la toxine diphtérique.....12

I. 3. 2. Structure de la toxine diphtérique.....13

I. 3. 3. Synthèse de la toxine.....14

I. 3. 4. Description générale du mode d'action de la toxine diphtérique.....15

Chapitre II : Les sérums thérapeutiques d'origine équine à usage humain.....17

II.1. Préambule sur la découverte des anticorps17

II. 1. 1. Les anticorps.....17

II. 1. 2. Mécanisme de la réponse adaptative face à un pathogène.....19

II.1. 2. 1. Fonctions effectrices des Ig Gamma.....21

II. 2. La sérothérapie.....	22
II. 2. 1. Définition de la sérothérapie.....	22
II. 2. 2. Naissance de la thérapie sérique.....	22
II. 2. 3. Les sérums thérapeutiques.....	23
II.2.3.1. Mode et voies classiques d'administration	24
II. 2. 4. Les étapes et techniques de production des sérums équinaux	24
II. 2. 4. 1. Immunisation des chevaux.	25
II. 2. 4. 2. Obtention du sérum.....	25
II. 2. 4. 3. Purification des immunoglobulines.....	25
II. 2. 4. 4. Mise en forme galénique.....	26
 Chapitre III : Contrôle de qualité des sérums thérapeutiques.....	28
 III.1. Contrôle de qualité.....	28
III.1.1. Définition de contrôle	28
III.1.2. Définition de la qualité.	28
 III.2. Contrôle des produits santé à la santé humaine.....	29
III.2.1. Caractéristique recherchée lors du contrôle des produits immunologiques.....	29
III.2.2. Contrôle de qualité des produits immunologiques en Algérie.....	29
III.2.2.1. Autorisation de Mise sur le marché (AMM).....	29
III.2.3. La pharmacopée.....	30
III.2.3.1. Structure et contenu de la monographie générale d'immunosérums d'origine animale pour usage humain.....	30
III.2.4. Méthodes générales d'analyse des sérums thérapeutiques finis.....	32
III.2.4.1. Contrôle de l'étiquette.....	33
III.2.4.2. Test d'apparence.....	33
III.2.4.3. Contrôle du volume.....	33
III.2.4.4. Tests physico-chimiques.....	33
III.2.4.5. Test d'innocuité.....	36
III.2.4.6. Essai de stérilité.	36
III.2.4.7. Test d'identité.....	36

Partie 2 : Partie expérimentale

Chapitre IV : Matériels et méthodes.....	39
 IV. 1. Présentation générale de l'institut Pasteur d'Alger.....	39
 IV. 2. Matériels utilisés.....	40

IV. 3. Méthodes utilisées.....	41
IV.3.1. Tests physico-chimiques.....	41
IV. 3. 1. 1. Méthodes dosage des protéines totales par la méthode de biuret.	41
IV. 3. 1. 2. Mesure du pH.....	43
IV. 3. 1. 3. Volume extractible.	44
IV. 3. 1. 4. Dosage de crésol.	45
IV.3. 2. Test de stérilité.....	46
IV. 3. 2. 1. Incubation sur milieu thioglycolate.....	46
IV. 3. 3. Test d'identité.....	47
IV. 3. 3. 1. Méthode d'Ouchterlony « technique de double diffusion en gel ».....	47
IV. 3. 4. Test d'innocuité.....	53
IV. 3. 4. 1. Contrôle de toxicité anormale sur souris.....	53
 Chapitre V : Résultats et discussion	56
 V.1. Tests physico-chimiques.....	56
V. 1.1. Dosage de protéines par biuret.....	56
V.1.2. Mesure du pH.	57
V.1.3. Volume extractible.	58
V.1.4. dosage du crésol.....	59
 V.2. Test d'identité.....	60
V.2.1. Méthode de double diffusion « Ouchterlony ».....	60
 V.3. Test de stérilité.....	61
V.3.1. Incubation sur milieu thioglycolate.....	61
 V.4. Test d'innocuité.....	62
V.4.1. Test de toxicité anormale.	62
 Conclusion	67
Référence bibliographique.....	69
Annexes	86
Résumé	

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Les tests utilisés dans le laboratoire de contrôle de qualité.	40
02	Les concentrations des solutions étalons.	42
03	Remplissage des tubes avec les différentes solutions pour dosage de protéines totales.	42
04	Remplissages des tubes avec les différentes solutions pour le dosage du crésol.	46
05	Poids initial des souris expérimentale.	53
06	Résultats du test de stérilité des tubesensemencé par sérum antidiphthérique.	61
07	Observation de l'état des souris expérimentale durant la durée de test.	62
08	Observation du changement de poids des souris expérimentales durant la durée de test.	63

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Répartition des cas positifs par tranche d'Age dans les Années 1993, 1994, 1995 en Algérie.	05
02	Angine diphtérique.	06
03	Diphtérie cutané.	07
04	Coloration de Gram de <i>C. diphtheriae</i> .	09
05	Observation des bacilles de <i>C. diphtheriae</i> sous microscope électronique x10000.	10
06	Aspects des colonies de <i>C. diphtheriae</i> sur gélose au sang frais.	11
07	Structure tridimensionnelle de la toxine diphtérique.	13
08	Régulation du fer dans la synthèse de la toxine diphtérique.	14
09	Activité de la toxine diphtérique dans une cellule eucaryote.	16
10	Structure des immunoglobulines.	18
11	Schéma de réponse immunitaire.	20
12	Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique.	22
13	Prélèvement de sang sur un cheval dans une annexe de l'Institut de sérum.	23
14	Schéma général de production des sérums thérapeutiques.	24
15	Techniques de purification des immunoglobulines : précipitation par les sels.	26
16	Structure chimique du phénol et les isomères du crésol.	34
17	Appareil de mesure d'osmolarité « Osmomètre ».	35
18	Principe simplifié de la floculation.	37
19	Principe de l'immunodiffusion sur gel d'agarose.	38
20	Entrée de l'institut pasteur d'Alger, Delly Brahim.	39
21	Lecture de l'absorbance par spectrophotomètre pour le dosage des protéines.	43
22	Mesure du pH du sérum antidiphtérique par un pH-metre 2007.	44
23	Aspect du milieu liquide au thioglycolate préparé.	47
24	Erlenmeyer contenant du gel d'agarose limpide sortie du bain marie.	49
25	Conservation de la lame dans une boîte en plastique et du flacon de vaccin au frais.	50
26	Série de dilution de sérum antidiphtérique.	50
27	Technique de séchage de la lame.	52

28	Technique de coloration et décoloration de la lame.	52
29	Incubation de souris injectées dans une cage dans une chambre d'incubation d'animalerie.	54
30	Apparition de la couleur violette après ajout du réactif biuret.	56
31	Réaction du phénol avec le 4-aminoantipyrine en présence du ferricyanure de potassium.	59
32	Apparition d'arcs de précipitations par méthode de double diffusion réaliser sur boîte de pétri.	60

Liste des abréviations

A

ADCC : Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.

ADN: Acide désoxyribonucléique.

ADP: Adénosine di-phosphate.

AMM: Autorisation de mise sur marché.

B

BSA: Bovine serum albumin

C

C : Celsius.

CDC : Cytotoxicité dépendante du complément.

CFD: Cellules folliculaires dendritiques.

C₁₁H₁₃N₃O: 4-amino-antipyrine

C₆H₆O: Phénol.

C₇H₈O: Tricrésol.

CPA: Cellule présentatrice d'antigène.

D

DAT: Diphtérie-Anti-Toxin.

DO: Densité optique.

DTQ: Diphtérie-Tétanos Coquelucheux.

E

EF-2: Elongation factor 2.

EPIC: Etablissement Public à Caractère Industriel.

F

Fab: Fragment antigen-binding.

Fc: Fragment cristallisable.

G

GTP : Guanosine triphosphate.

g : Gramme.

H

HB-EGF: Heparin-Binding Epidermal Growth Factor.

HCL: Acide chlorhydrique.

HSPG: Heparan-Sulfate-Proteo-Glycan.

h : Heure.

I

Ig : Immunoglobuline.

IL 2 : Interleukine 2.

ISO: International organisation for standardization.

K

K₃[Fe(CN)₆] : Phosphate monopotassique.

L

L : Litre.

LB : Lymphocyte B.

LBm : Lymphocyte B mémoire.

LT : Lymphocyte T.

LT CD4 : Lymphocyte T cluster de différenciation 4.

LT CD8 : Lymphocyte T cluster de différenciation 8.

LTc : Lymphocyte T cytotoxique.

LTh : Lymphocyte T helper.

M

mg : Milligramme.

ml : Millilitre.

min : Minute.

N

NaCl : Chlorure de sodium.

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium anhydre.

NaHCO₃ : Bicarbonate de sodium.

nm : Nanomètre

NI : Norme interne.

NK : Natural Killer.

P

PCR : Polymerase chain reaction.

PE : Pharmacopée Européenne.

PSB : Phosphate buffered saline.

Q

QSP : Quantité suffisante pour.

T

TD : Toxine diphtérique.

tRNA : Acides Ribonucléiques de transfert.

U

UI : Unite international.

ul : microlitre.

W

WHO : World health Organisation.

Introduction

La diphtérie est une maladie épidémique et contagieuse interhumaine, principalement due un bacille Gram positif aérobie, *Corynebacterium diphtheriae* et plus rarement par *Corynebacterium ulcerans* ou *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Alberto, 2017). Fréquente dans l'enfance, elle est déterminée par la formation de fausses membranes dans la gorge (angine diphtérique) et le larynx (croup ou laryngo-trachéo-bronchite). Cette dernière a été longtemps considérée comme un fléau et l'une des principales causes de mortalité infantile décimant une partie importante de la population et ça depuis le XIX ème siècle (Radut, 2001).

Vers la fin du XX éme siècle, Behring en Allemagne et Roux en France, ont découvert que le sérum antidiphtérique (obtenu chez les chevaux injectés à plusieurs reprises de bacilles de Löffler) à une action curative (Guariat, 2012). En effet la découverte de ces produits de révolution scientifique eut un retentissement extraordinaire ; le sérum fut employé sur une large échelle et à pu éviter des millions de morts. Et c'est ainsi qu'était née la *Sérum-Thérapie*, ou sérothérapie en français (Watier, 2009).

Cette révolution thérapeutique et médicale participa indéniablement d'une par à poser des principes de base de l'immunologie (Demont, 2015), et d'autre part à la naissance d'une industrie biotechnologique, même si le terme n'existait pas encore à cette époque ; il a fallut alors produire d'énormes quantités de sérum, le standardiser, le conditionner et assurer sa distribution dans les quatre coins du monde (Gachelin et al., 2013).

Aujourd'hui la libération des sérums thérapeutiques ne s'effectue qu'après être contrôlés lot par lot indépendamment, ces contrôles sont importants avant l'exploitation de ces types de produits (Houari, 2017). Ces contrôles sont destinés à vérifier la conformité des lots avec les référentiels en vigueur (Pharmacopée international et par les recommandations de l'OMS) et les spécifications approuvées dans le dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM) (WHO, 1995).

Dans ce contexte notre étude à été mené au sein de l'Institut Pasteur d'Alger afin de contribuer au contrôle de ces produits. En effet l'objectif principal de ce travail a porté sur la vérification de la validation des différents tests exigés par la documentation Européenne sur le sérum antidiphtérique, importé par l'autorité nationale afin d'être utilisé pour le traitement au niveau national.

La présente étude s'organise autour de deux parties :

La première partie est consacrée à une recherche bibliographique, elle est subdivisée en trois chapitres, le premier chapitre est consacré aux généralités sur la diphtérie, la bactérie *Corynebacterium diphtheria* et sur sa toxine ainsi que la découverte de l'anatoxine ; le deuxième chapitre présente la découverte de la sérothérapie, ainsi que l'immunisation des chevaux et le troisième chapitre porte sur le contrôle de qualité des produits thérapeutiques à usage humain ; en l'occurrence les différentes méthodes exigées par la documentation Européenne.

La deuxième partie est réservée à la partie expérimentale, elle contient deux chapitres ; le chapitre quatre présente le matériel et les différentes méthodes utilisées pour la vérification et le contrôle du sérum par l'Institut Pasteur d'Alger. Le cinquième chapitre de ce travail est réservé à la présentation et discussion des résultats obtenus concernant :

- Le dosage des protéines totales.
- La mesure du pH.
- Vérification du volume extractible.
- Dosage de préservateur.
- Le test d'identité.
- Le test de stérilité.
- Le test d'innocuité.

Cette étude s'achève par une conclusion suivie par des références bibliographiques et des annexes.

Notre pays fait face à l'épreuve d'une pandémie du Coronavirus (COVID-19), nouvelle pour l'humanité, non identifiée et dont la propagation est rapide.

La propagation de la pandémie a poussé les autorités sanitaires nationales à prendre une décision extrême, un confinement total a été appliqué. Cette stratégie consiste à limiter les déplacements entre et intra villes avec des mesures préventives et une distanciation sociale et des bonnes habitudes d'hygiène bien appliquées par les citoyens jusqu'à la disparition de l'épidémie.

Cette décision est venue en vue de sauvegarder les vies et pour ne pas payer le prix cher mais a eu des conséquences considérables sur l'avancement de la partie pratique, qui n'a malheureusement pas pu être achevée complètement.

Partie 1 :

Recherche bibliographique

Chapitre I :

Généralité sur la diphtérie et son agent causal

I. Généralité sur la diphtérie et son agent causal

I.1. La diphtérie

I.1.1. Définition de la diphtérie

Le terme « Diphtérie » provient du grec « Διφθεριτισ ou Diphtheria », qui signifie « membrane » en rapport avec l'aspect clinique visible de la maladie (Littré, 1889).

La diphtérie est à la fois une maladie toxinique et bactérienne aiguë (Gentilini et Duflo, 2012), avec un taux considérable de mortalité causé par des souches toxigènes du complexe corynébactéries (Krifi, 2017) rendus lysogènes par le phage tempéré β , dont les symptômes cliniques sont liés à la capacité de ces souches à produire une protéine extracellulaire, la toxine diphtérique« DT » (Selim et al., 2016).

Trois espèces productrices de toxines ont été identifiées ; *Corynebacterium diphtheriae* est le plus souvent associé comme principale cause de cette maladie avec un réservoir principalement humain. Deux moins fréquentes souche d'origine animale et considéré comme zoonose ; *Corynebacterium ulcerans* et *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Wagner et al., 2009).

I.1.2. Historique

La diphtérie était décrite pour la première fois par Bretonneau en 1818 (Variot, 1898), qui constate qu'elle débute toujours par une angine pseudomembraneuse et l'appelle «diphtérie» (Aaron et al., 2006).

L'agent causal est mis en évidence pour la première fois par Klebs en 1883qui observe des bacilles au niveau des fausses membranes d'un patient atteint de diphtérie ; en 1884, Loeffler cultive ces souches sur sérum coagulé, démontre leur rôle dans l'étiologie de la diphtérie et suggère ainsi l'existence d'une toxine qui serait responsable des lésions tissulaire étendues (Kaba, 2004).

En 1888, Roux et Yersin montrent que les filtrats obtenus à partir de cultures de bacilles diphtériques provoquent la mort de l'animal en reproduisant chez lui les signes essentiels de la maladie naturelle (Vallery, 1938). En 1890, Von Behring et Kitassato découvrent les propriétés antitoxiques du sérum de cobaye vacciné, « chevaux ». Roux, Martin et Chailloux en 1894 appliquent pour la première fois la sérothérapie à l'homme (Kaba, 2004).

En 1923, Ramon met au point l'anatoxine utilisée pour la vaccination en traitant la toxine par le formol et la chaleur (Theodorides, 1986).

En 1951, Freeman découvre que la toxine diphtérique est produite seulement par les souches de *C. diphtheriae* lysogènes par un bactériophage tempéré porteur du gène *tox*, le phage β (Freeman, 1951).

Enfin, au jour d'aujourd'hui le mécanisme d'action moléculaire de la toxine diphtérique est connu avec précision.

I.1.3. Epidémiologie

La diphtérie est une maladie connue depuis l'antiquité. Celle-ci semble originaire du Moyen Orient et elle s'est probablement propagée de l'Europe vers d'autres continents (l'Amérique, Afrique) (François, 2003). De nombreuses vagues d'épidémies de diphtérie sont survenues en Europe souvent liées aux temps de guerre (Rey et al., 1996). A la fin du 18ème siècle et le début du 19ème siècle, la diphtérie a été considérée la principale cause de mortalité la plus courante (Galazka et Robertson, 1995).

Depuis l'instauration de la vaccination obligatoire en 1945, l'incidence de la diphtérie a régulièrement baissé dans le monde (Dumas et al., 2017). Malgré ce vaste programme de vaccination celle-ci a fait sa réapparition sur le mode épidémique depuis 1990 (Galazaka et al., 1995).

La raison de sa réapparition pourrait être liée à l'augmentation de la population urbaine avec le début de l'industrialisation associée aux mauvaises conditions socio-économiques de la classe ouvrière, la couverture vaccinale insuffisante permettant la propagation de l'infection et l'émergence de foyers épidémiques ainsi que les mouvements de population importants (Galazaka et al., 1993).

L'Algérie a également connu une recrudescence de la maladie avec trois épidémies en 1993, 1994 et 1995 (Figure 1) (Senouci et al., 2004). Diverses régions du pays ont été touchées particulièrement le centre du pays (Bouira, Tizi Ouzou, Sidi Aich), l'Est (Batna) et le Sud (Adrar, El Oued) où la population est sujet de déplacements fréquents. La tranche d'âge la plus touchée était de 11 à 20 ans (Belhocine et Rahal, 1997).

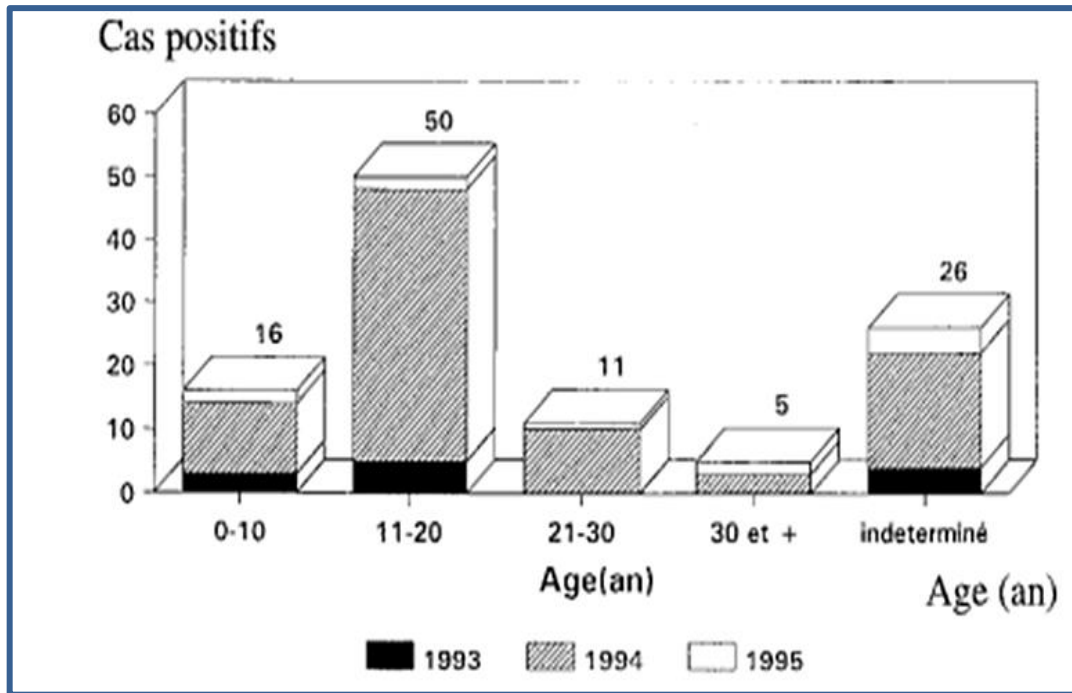


Figure 1 : Répartition des cas positifs par tranche d'Age dans les années 1993, 1994, 1995 en Algérie (Belhocine et Kahal, 1997).

Bien que la maladie est actuellement contrôlée (aucun cas de diphtérie n'a été enregistré depuis 2007), grâce à la couverture vaccinale élevée chez les enfants et les adultes. Le risque de réapparition de la diphtérie n'est pas à écarter. En effet, l'Algérie constitue une destination des immigrants venus d'Afrique et une zone de transit d'une partie de ces immigrants vers l'Europe. De plus, dans le contexte d'instabilité connu par plusieurs pays du Moyen-Orient et d'Afrique, le pays est aussi une destination des réfugiés et demandeurs d'asile (Benamrouche, 2015).

Actuellement, la diphtérie est présente partout dans le monde et est toujours endémique dans de nombreux pays. Les voyageurs qui ne sont pas complètement vaccinés peuvent être exposés au risque d'attraper la diphtérie lorsqu'ils visitent un pays dans lequel la maladie est encore prévalent. Les pays où des éclosions d'épidémies ont annuellement lieu à travers le monde « Yémen, Bangladesh et Indonésie en 2017 et le Venezuela en 2018 » (Coen et al., 2019). Suivit de certains pays d'Europe de l'Est (l'ex URSS) et dans d'autres parties du monde comme ; l'Amérique du Sud (Brésil, Equateur), l'Asie de l'Est (Thaïlande, Inde, Indonésie, Népal, Philippines) et l'Afrique (Madagascar, Zambie, Nigéria) (Alberto, 2017).

I.1.4. Les symptômes de la diphtérie

La diphtérie est une infection bactérienne aiguë du pharynx, des amygdales, du nez et parfois d'autres muqueuses et de la peau. Sa transmission est interhumaine et directe par gouttelettes provenant des voies aériennes supérieures (voie respiratoire) ou par contact cutané (contact physique proche) (Descy et Piret, 2017).

Les symptômes de la diphtérie respiratoires apparaissent habituellement après une période d'incubation de 2 à 5 jours (Clevy et al., 2014). Le début de la maladie est relativement caractérisé par une fièvre modérée et une angine. Le symptôme caractéristique est la présence de fausses membranes au siège de la multiplication des bacilles diphtériques au niveau du rhinopharynx, reconnaissables à leur aspect grisâtre et à leur ancrage aux tissus sous-jacents. Ces pseudomembranes peuvent s'étendre jusqu' au fond de la gorge provoquant une obstruction des voies aériennes (Figure 2) (Pebret, 2003). Un œdème local peut apparaître au niveaux du cou par gonflement visible du cou (diphtérie nasopharyngée aiguë) (Maurice, 1920).



Figure 2 : Angine diphtérique (Lien 1).

La diphtérie cutanée quant à elle, se transmet à partir de sécrétions rhinopharyngées ou contact direct avec des ulcères cutanés. La porte d'entrée est souvent une plaie. Les symptômes caractéristiques sont initialement des pustules, qui par la suite deviennent en une forme d'ulcère douloureux ronds de couleur violacée, à bordure indurée (Figure 3). Une pseudomembrane grise

recouvrant la lésion est souvent présente dans les premières 1 à 2 semaines mais après sa séparation un exsudat séreux devient apparent (Alberto et al., 2016). Des lésions toxiques peuvent également être observées dans des organes tels que le myocarde, les reins et le système nerveux (Coen et al., 2019).



Figure 3 : Diphtérie cutanée (Lien 2).

Les infections cliniques définies par l’OMS qui suivent sont associées à un risque accru de maladie systémique provoquée par la toxine (WHO, 2006) :

- la forme catarrhale : érythème du pharynx, par de fausse membrane.
- la forme folliculaire : plaques exsudatives sur le pharynx et les amygdales.
- la forme extensive : fausses membranes couvrant les amygdales et l’arrière du pharynx.
- la forme associée : plusieurs sites anatomiques touchés, e.g. la gorge et la peau.

I.1.5. Traitement de la diphtérie

La diphtérie est une urgence thérapeutique imposant l’hospitalisation. Le traitement le plus efficace contre la diphtérie est l’administration rapide d’antitoxine diphtérique DAT (Diphtheria Antitoxine) accompagnée d’une antibiothérapie conjointe (Both et al., 2014).

Car en effet l’immunité repose essentiellement sur la réponse anticorps dirigée contre la toxine. Cette antitoxine circule à travers tout l’organisme et passe aisément la barrière

placentaire, procurant ainsi une immunité passive au nouveau-né durant les premiers mois de sa vie. Cette antitoxine peut être induite soit directement (sérothérapie), soit par la vaccination avec l'anatoxine diphtérique (Galazaka et al., 1993).

➤ **L'antibiothérapie**

Elle repose sur l'administration d'une dose unique de benzathine pénicilline G (dose adulte : 2 M UI et dose enfant : 100000 UI) ou érythromycine PO 500 mg 4 fois par jours ; pendant 7 jours (en cas d'allergie aux bêta-lactamines). Ces traitements servent à éradiquer rapidement le foyer bactérien (Coen et al., 2019).

➤ **La vaccination**

La vaccination par l'anatoxine diphtérique (associé à celle antitétanique et anticoquelucheuse) est obligatoire durant la première année de la vie. Elle pratique selon une modalité liée au statut vaccinal antérieur et aux recommandations du calendrier vaccination (Annexe 2) (WHO, 2013).

➤ **La sérothérapie**

Elle fait appel à du sérum antidiphtérique, anticorps purifiés équin. Ils ne peuvent neutraliser que la toxine libre dans la circulation, mais pas celle déjà fixée dans les tissus. Cela explique l'importance d'une administration précoce. Une seule injection est habituellement suffisante (Wagner et al., 2009).

I.2. *Corynebacterium diphtheriae* ou bacille de klebs et Loeffler

Découverte en 1884 par les bactériologistes allemands Edwin Klebs et Friedrich Loeffler (Agust, 2016). L'espèce *Corynebacterium diphtheriae*, agent de la diphtérie est un bacille Gram positif non motif, non capsulé se présente sous forme de bâtonnets fins droits ou légèrement incurvés, de longueur variable (Figure 4). Ces bacilles sont associés en paires, dont les extrémités sont plus ou moins effilées ou renflées, donnant un aspect en massue caractéristique (Coen et al., 2019). *C. diphtheriae* est classé en biotypes (gravis, mitis, belfanti et intermedius) (McLeod, 1943).

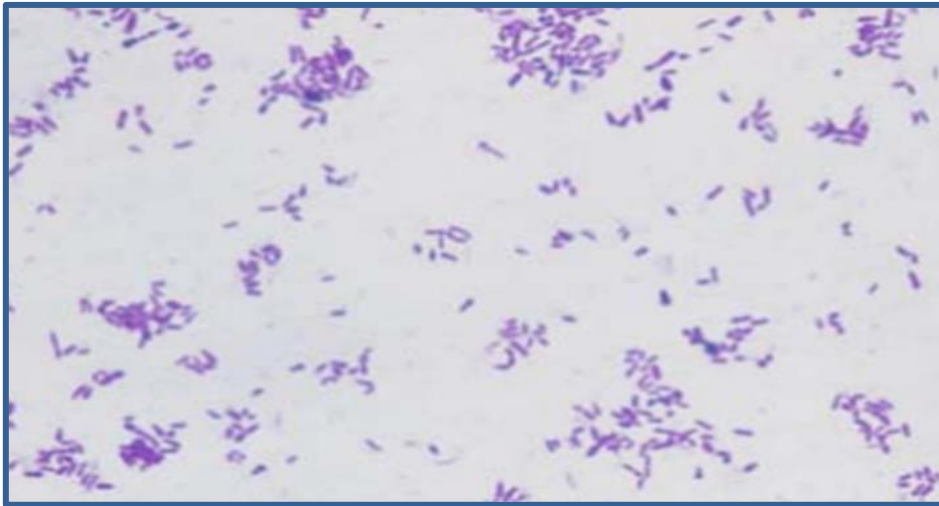


Figure 4 : Coloration de Gram de *C. diphtheriae* (Wytzman, 2003).

I.2.1. Classification

C. diphtheriae appartient au (Goodfellow et al., 2012; Lien 3) :

- **Domaine:** *Bacteria*.
- **Phylum:** *Actinobacteria*.
- **Classe:** *Actinobacteria*.
- **Ordre:** *Corynebacteriales*.
- **Famille:** *Corynebacteriaceae*.
- **Genre:** *Corynebacterium*.
- **Espèce:** *diphtheriae*.

I.2.2. Taxonomie et Habitat

Les bactéries du genre *Corynebacterium* sont des bacilles à Gram-positif, à haut contenu G-C (54%), la plupart aérobies, non mobiles et faisant partie du groupe des Actinomycètes. Les corynébactéries ne forment pas de spores comme les Actinomycètes mais possèdent leur caractéristique de forme irrégulière (Liebl, 2006). Ces bactéries font partie de la flore normale de l'homme (peau et muqueuses), des animaux et peuvent être présentes également dans l'environnement (air, sol .etc.). Elle comporte 88 espèces, très répandues chez l'animal, y compris l'Homme (Ott et Burkovski, 2014).

On distingue *C. diphtheriae*, l'agent étiologique principal de la diphtérie chez l'homme et elle n'est pas considérée comme pathogène zoonotique (Figure 5) (Bernard et al., 2012). Les *C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis* quant à eux sont notamment considérés comme agents de la

diphthérie. Ils ont la capacité de sécréter la toxine diphthérique qui est l'une des principale cause de cette maladie (Selim et al., 2016), mais ils sont moins fréquents chez l'homme et traditionnellement associés au contact avec des animaux de ferme ou des produits laitiers (Hatanaka et al., 2003).



Figure 5 : Observation des bacilles de *C. diphtheriae* sous microscope électronique x 10000 (Gauriat, 2012).

1.2.3. Culture

Corynebacterium diphtheriae est une bactérie chémoorganotrophe, aéro-anaérobie facultative (à métabolisme respiratoire et fermentatif). Elle est dite exigeante car elle exige des milieux nutritifs enrichis de sérum de sang (Figure 6), ou de sérum de bœuf coagulé « milieu de Loeffler », en présence de nombreux facteurs de croissance (acides aminés et coenzymes). Les colonies obtenues en 24h d'incubation à 37°C avec un pH avoisinant 7,4 sont lisses, blanchâtres à grisâtres et atteignent 1 à 3 mm (Gauriat, 2012).

Sur milieu « Tinsdale », des colonies noires sont obtenue entourées d'une étroite zone de couleur brun. Ces principaux caractère biochimiques ; elles ont tendance a fermenté le glucose et le maltose sans production de gaz, ne produisent ni uréase, ni indole, ni gélatinase mais possèdent une catalase positive. Le diagnostic de la maladie repose donc à la recherche de ces caractères une fois les symptômes apparus (Baron et al 1998).

La présence de toxine se détecte habituellement par le test d'immunoprécipitation en milieu gélosé (test d'Elek), tandis que la recherche directe du gène *tox* se fait par amplification génique « PCR » (Riegel, 1998).



Figure 6 : Aspects des colonies de *C. diphtheriae* sur gélose au sang frais (Benamrouche, 2015).

I.2.4. Facteurs de pathogénicité

I.2.4.1. Les principaux antigènes

Le facteur de virulence le plus important de *C. diphtheriae* est l'exotoxine diphtérique, un polypeptide codé par le chromosome bactérien. En dehors de la cellule de l'hôte, l'exotoxine est relativement inactive, mais, suite à sa fixation cellulaire et à son internalisation par l'intermédiaire de son fragment (B) non toxique ; un fragment hautement toxique (A) se détache et provoque la mort de la cellule par inhibition de la synthèse des protéines cellulaires (Collier et al., 1975).

Outre l'exotoxine bactérienne qu'elle produit, les constituants de sa paroi cellulaire tels que les antigènes O et K sont importants dans la pathogénèse de la maladie. L'antigène O thermostable est commun à toutes les corynébactéries, tandis que l'antigène K, il est thermolabile et variable ce qui permet la différenciation entre les différentes souches. De plus, l'antigène K est important pour la fixation aux muqueuses (WHO, 2006).

I.2.4.2. Les pili ou les fimbriae

Les pili ou fimbriae sont des protéines filamenteuses, médiateurs de l'adhésion et de la colonisation des tissus de l'hôte (Wu et Fives, 2001). Certains types de pili sont impliqués dans l'attachement des corynébactéries aux cellules épithéliales humaines (Mandlik et al., 2007). Ils peuvent également interagir avec d'autres bactéries pour créer des biofilms (Yeung et al., 1999).

I.2.4.3. Les adhésines

Le processus d'adhésion chez *C. diphtheriae* implique des structures de nature protéique trouvées à la surface de la bactérie, appelées adhésines. Ces dernières sont capables de reconnaître et de se fixer au récepteur spécifique des cellules hôtes. Les degrés d'adhérence aux cellules sont liés à la concentration de ces protéines exprimées à la surface de la bactérie (Colombo et al., 2001).

Les souches de *C. diphtheriae* sont ainsi capables d'adhérer aux récepteurs des macrophages de l'organisme ce qui induit à une nécrose et une apoptose (Dos Santos et al., 2010).

I.3. La toxine diphtérique

I.3.1. Définition de la toxine diphtérique

La toxine diphtérique est une protéine sous forme d'une chaîne polypeptidique unique, fragile et identique pour toutes les souches de *C. diphtheria* responsable des symptômes de la maladie (London, 1992). Elle est produite par des bacilles rendus lysogènes par le phage tempéré β ; il s'agit de phages à ADN bi-caténaire qui apporte à la bactérie l'information nécessaire à la synthèse de cette toxine (Freeman et al., 1951).

I.3.2. Structure de la toxine diphtérique

Il s'agit d'une exotoxine protéique qui contient 536 acides aminés et qui est synthétisée sous la forme d'un peptide précurseur (proenzyme) de 60 kDa qui est activé par clivage en deux sous-unités A et B (associées par un pont disulfure) (Figure 7) (Pattey et Dellion, 1999).

La sous-unité A : support de l'activité toxique ADP-ribosylation (environ 21kDa). Cette sous-unité est très stable.

La sous-unité B : permet la fixation de la toxine sur le récepteur cellulaire (environ 40 kDa). Celle-ci est très instable.

Les deux sous-unités sont reliées par une liaison peptidique et un pont disulfure. Cette proenzyme comprend 3 domaines (Chassaing, 2008) :

- Un domaine de fixation aux récepteurs (R).
- Un domaine hydrophobe de translocation à travers la membrane endosomale (T).
- Un domaine enzymatique (la sous-unité A ou domaine C).

La conformation tridimensionnelle des domaines de la toxine diphtérique est en « Y ». Le domaine (T) forme la partie inférieure, les domaines (C) et (R) forme les bras du « Y ». Le domaine (T) est un assemblage d'hélices α et le domaine (R) de feuilletts β aplatis. Le domaine (C) est formé de feuilletts β et de hélices α (Collier et al., 2001).

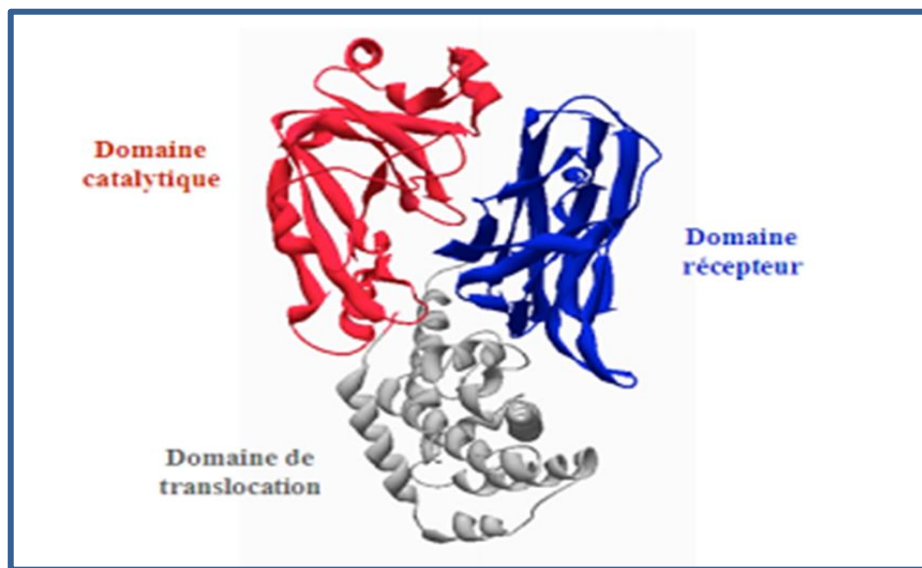


Figure 7 : Structure tridimensionnelle de la toxine diphtérique (Chassaing, 2008).

I.3.3. Synthèse de la toxine diphtérique

La toxine diphtérique est synthétisée par une souche *C. diphtheriae* possédant un génome de bactériophage porteur du gène de structure *tox* capables de produire la toxine diphtérique. La production de la toxine par *C. diphtheriae* a été initialement observée chez des souches lysogènes pour le phage β (Uchida et al., 1971).

Dans un milieu optimal, la toxine diphtérique est sécrétée et peut atteindre une concentration finale de 400 – 500 ug / ml. Le gène répresseur de la diphtérie-toxine (dtxR) est connu pour réguler la transcription du gène de la toxine diphtérique « *tox* » par un mécanisme indépendant (Umata et al., 2000).

La présence du fer même à des concentrations critique de 0.1 ug/ml dans le milieu de croissance joue un rôle de facteur limitant, ce qui inhibe la production de toxine diphtérique. Par liaison du fer avec le DtxR, le complexe « DtxR-F » se lie à son tour à l'opérateur (Op) du gène *tox* et agit comme un répresseur transcriptionnel du gène *tox* (Figure 8). Dans le cas où les concentrations intracellulaires en fer sont basses, le gène régulateur *dtxR* est inhibé, résultant de l'augmentation de la production de la TD par les souches de *C. diphtheriae* (Fierer et al., 2017).

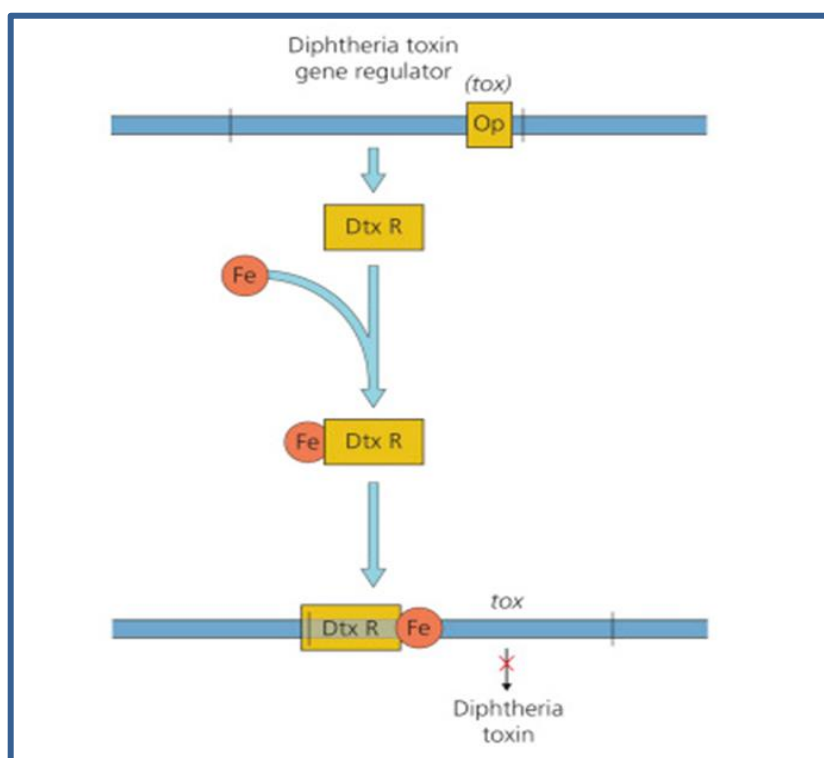


Figure 8 : Régulation du fer dans la synthèse de la toxine diphtérique (Fierer et al., 2017).

➤ Origine du gène *tox*

Le gène *tox* est présent dans des corynébactériophages tel que les phages β , et sont capables d'intégrer les chromosomes de *C. diphtheriae*. Le gène *tox* codant pour la toxine diphtérique, est situé sur le chromosome du phage. Par insertion du gène dans le chromosome bactérien, les souches *C. diphtheriae* deviennent toxigènes (Holmes et al., 2000).

I.3.4. Description générale du mode d'action de la toxine diphtérique

Le mécanisme d'intoxication d'une cellule eucaryote sensible à la toxine diphtérique se caractérise par une série d'événements qui conduisent à une inhibition irréversible de la synthèse protéique et à la mort cellulaire. Les étapes du mécanisme d'intoxication par la toxine diphtérique (Umata et al., 2002) :

- La toxine se fixe grâce à son domaine (R) à un récepteur cellulaire : le pro-HB-EGF (*Heparine-Binding EGF-Like Growth Factor*) et aux co-récepteurs *CD-9* et *HSPG* (*Heparan-Sulfate-Proteo-Glycan*) (Figure 9).
- Le complexe toxine-récepteur est internalisée par les endosomes.
- Dans l'endosome, l'acidification du pH conduit à un changement de conformation du domaine (T) qui s'insère dans la membrane de l'endosome et participe à la translocation vers le cytosol.
- Le domaine (C) est donc libéré dans le cytoplasme, où elle catalyse la réaction ADP-ribosylase.
- La cible de l'ADP-ribosylase est le facteur EF-2 d'élongation, une petite G-protéine qui permet la translocation du peptidyl-tRNA du site A au site P des ribosomes en présence de GTP.
- L'inactivation de ce facteur EF-2 entraîne ainsi l'arrêt de l'élongation des chaînes peptidiques et par conséquent l'inhibition de la synthèse protéique entraînant la mort de la cellule (London et al., 1992).

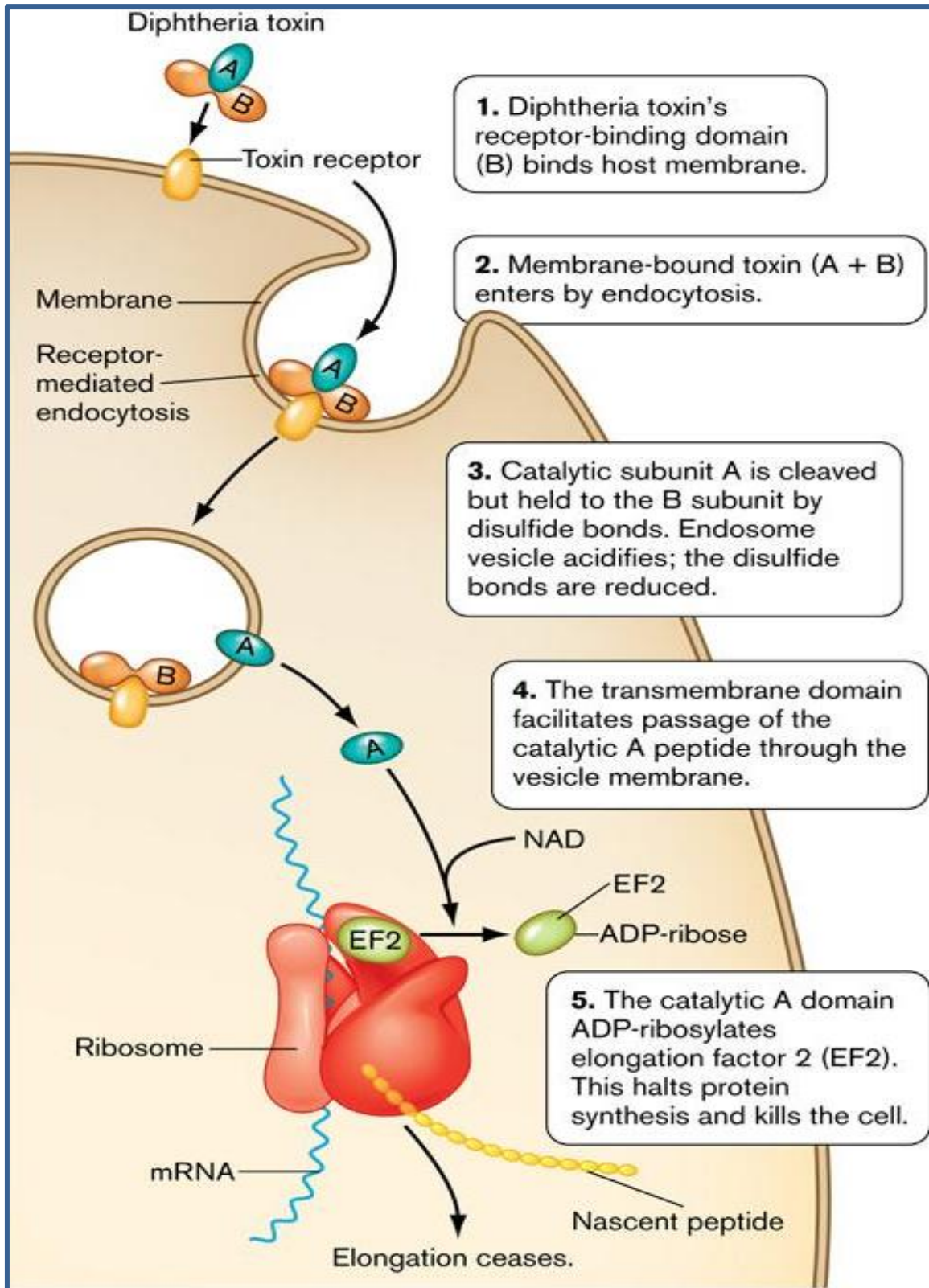


Figure 9 : Activité de la toxine diphtérique dans une cellule eucaryote (Lien 4).

*Chapitre II : Les sérums thérapeutiques
d'origine équine à usage humain*

Chapitre II : Les sérums thérapeutiques d'origine équine à usage humain

II.1. Préambule sur la découverte des anticorps

L'immunologie est une science relativement nouvelle. Son origine est attribuée à [Edward Jenner](#) qui a découvert que la vaccine, induit une protection contre la variole humaine, une maladie souvent mortelle ([Letonturier, 2007](#)).

En effet le système immunitaire des vertébrés est doté de deux types de réponses : la réponse immunitaire innée (non spécifique) et la réponse immunitaire adaptative (spécifique). L'immunité adaptative ou acquise est l'immunité secondaire qui se met en place lorsque l'immunité innée ne parvient pas à empêcher le pathogène de pénétrer à l'intérieur de l'organisme. L'immunité humorale s'inscrit dans l'immunité adaptative qui se définit par deux principales caractéristiques, la spécificité et la mémoire ([Rumelhard, 1990](#)).

Dès la fin du 19^{ème} siècle, le terme d'immunité humorale venait à l'origine du fait que des éléments responsables de la protection contre divers pathogènes étaient des anticorps ([Mcgonagle et Mcdermott, 2006](#)). Cette découverte est attribuée à [Emil Von Behring](#) et [Kitasato Shibasaburo](#) qui, en 1890, ont réalisé que l'injection de sérum d'animaux immunisés avec du tétanos atténué permettait de protéger les animaux receveurs quand ils étaient par la suite infectés avec du tétanos pathogénique ([WinauF et WinauR, 2002](#)).

II.1.1. Les Anticorps

Les anticorps sont des protéines solubles effectrices de l'immunité humorale spécifique, appelés *immunoglobulines* « Ig ». Elles comportent deux parties formées de 4 chaînes polypeptidiques ([Alberts et al., 2002](#)). Deux chaînes lourdes identiques et deux chaînes légères identiques (Figure 10) ([Schroeder et al., 2010](#)).

- La partie *Fab* est formée de l'association entre chaîne lourde et chaîne légère, elle assure la fonction de reconnaissance spécifique de l'antigène, capable de reconnaître l'épitope (zone de l'antigène reconnue par l'anticorps) de façon native ([Delves et al., 2008](#)). Trois principales fonctions sont associées à cette partie Fab ([Ritro, 2017](#)) :

- la neutralisation des toxines bactériennes.
- l'inhibition de l'adhésion des bactéries aux surfaces cellulaires.
- le blocage de la fixation du virus à son récepteur.

- La partie *Fc*, est formée uniquement par les chaînes lourdes de l'immunoglobuline, qui donne la classe d'un anticorps, nommée aussi isotype (Delves et al., 2008).

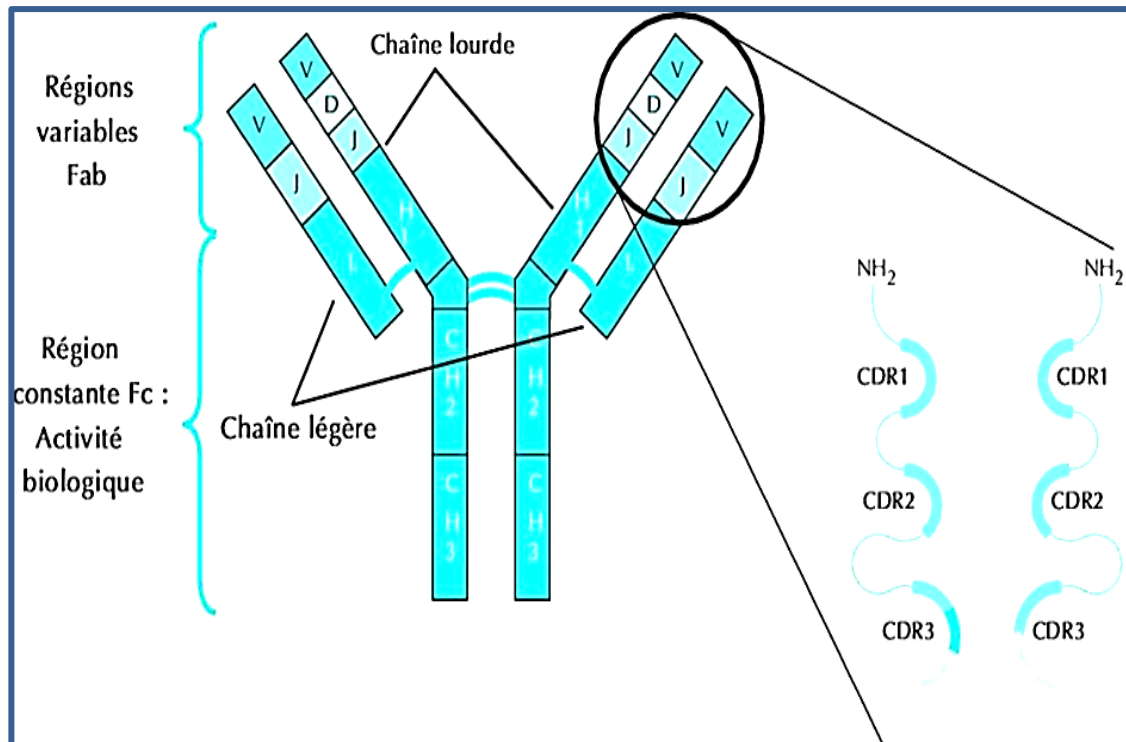


Figure 10 : Structure des immunoglobulines (Nouar, 2015).

Il existe ainsi 5 classes d'anticorps dont :

- Les IgM**, premières produites par les plasmocytes suite à une primo-infection par un agent pathogène et généralement associées aux Fab ayant le moins d'affinité pour l'antigène (Schroeder et Cavacini, 2010).
- Les IgA** assurent l'immunité des muqueuses dans la lumière du tube digestif (antigènes intestinaux dont les aliments, et le microbiote intestinal (Schroeder et Cavacini, 2010).
- Les IgE** sont importantes pour la réponse contre les infections parasitaires en général, et les helminthes en particulier. Elles sont aussi responsables des allergies (Galli et Tsai, 2012).
- Les IgG** assurent quant à elles les fonctions de neutralisation (que ce soit des microorganismes ou les toxines). C'est la classe d'anticorps prédominante du sérum et elle présente 4 sous-classes aux multiples rôles (Vidarsson et al., 2014).
- Les IgD** quant à cela elles sont uniquement membranaires lymphocytes B où elles fixent les antigènes, leur fonction n'est pas encore éclaircie (Edholm et al., 2011).

II.1.2. Mécanisme de la réponse adaptative face à un pathogène

Les mécanismes effecteurs de l'immunité adaptative ne préexistent pas, ils s'acquièrent spécifiquement face à un intrus. L'immunité adaptative se met donc en place 4 à 5 jours suite à la reconnaissance spécifique de l'agent infectieux par les cellules présentatrice d'antigène « CPA » qui activent alors des cellules spécifiques de l'immunité adaptative dont les lymphocytes (Daoudi, 2016). Elle fait intervenir deux types de réponses (Kierszenbaum, 2006) (Figure 11).

La première réponse est médiée par les *lymphocytes B* « LB » qui portent à leur surface un récepteur *BCR* (*B Cell Receptor*), qui correspond à un anticorps membranaire (Pailloux, 1981). La reconnaissance spécifique entre un *BCR* et l'antigène correspondant (sélection clonale) entraîne l'activation du *LB*, sa multiplication par mitose (prolifération clonale) et enfin sa différenciation en plasmocytes sécrétant des anticorps (de type *IgM*) (Abbas et al., 2020). Et en *lymphocytes B mémoire* « *LBm* » ; cellules à durée de vie longue stockée dans les organes lymphatiques, qui expriment des immunoglobulines comme récepteurs d'antigènes et seront prêtes à réagir rapidement en cas d'une nouvelle attaque par un même antigène. Les anticorps circulants caractérisent la réponse à médiation humorale (Male, 2019)

Les *lymphocytes T* « *LT* » contrôlent également les réponses immunitaires. Chaque type de réponse est contrôlé par des lymphocytes différents (Tortora et Derrickson, 2017). Ils reconnaissent l'antigène présenté à la surface de ces dernières porté par une molécule de complexe majeur d'histocompatibilité (*CMH*) (Weill et Batteux, 2003).

➤ Le type *LT CD4*

Ce type réagit à un antigène présenté par les cellules présentatrices d'antigènes *CPA* (complexe antigène / récepteur *CMH classe II*). Par la suite elles se multiplient par mitoses et se transforment en *LT4 mémoire*, et en *lymphocytes T auxiliaires* « *LTh* » sécrétant de messagers chimiques. La sécrétion de l'*interleukine 2* « *IL2* » stimule la différenciation des *LB* en plasmocytes (cellules sécrétrices d'anticorps solubles). Par un phénomène dit maturation d'affinité, aboutit à la production des classes des « *Ig* » (*IgG*, *IgA* et les *IgE*) (Abbas et al., 2020) permettant ainsi la neutralisation de l'antigène (Chapel et al., 2004).

➤ Le type LT CD8

Ce type reconnaît les antigènes / *CMH classe I* des cellules présentatrices d'antigènes et les récepteurs T (des *lymphocytes T CD8*). Cette reconnaissance est stimulée par les interleukines. Les *LT CD8* acteurs de la réponse cellulaire vont donc se transformer en *LT8* mémoire et en cellules tueuses, les *lymphocytes cytotoxiques* « *LTc* » (Kierszenbaum, 2006), capables de détruire les cellules anormales par un mécanisme d'élimination : Apoptose (Nicolas et Thivolet, 1998). Celle-ci constitue la deuxième réponse adaptative à médiation cellulaire (Kierszenbaum, 2006).

Suite à la neutralisation des antigènes, les phagocytes (e.g. *macrophage*) englobent et détruisent les complexes anticorps/ antigène, ainsi que les débris cellulaires, grâce à des lysosomes trouvés à l'intérieur de ces grosses molécules. Ces déchets vont être rejetés par phénomène exocytose (Cooper, 1999).

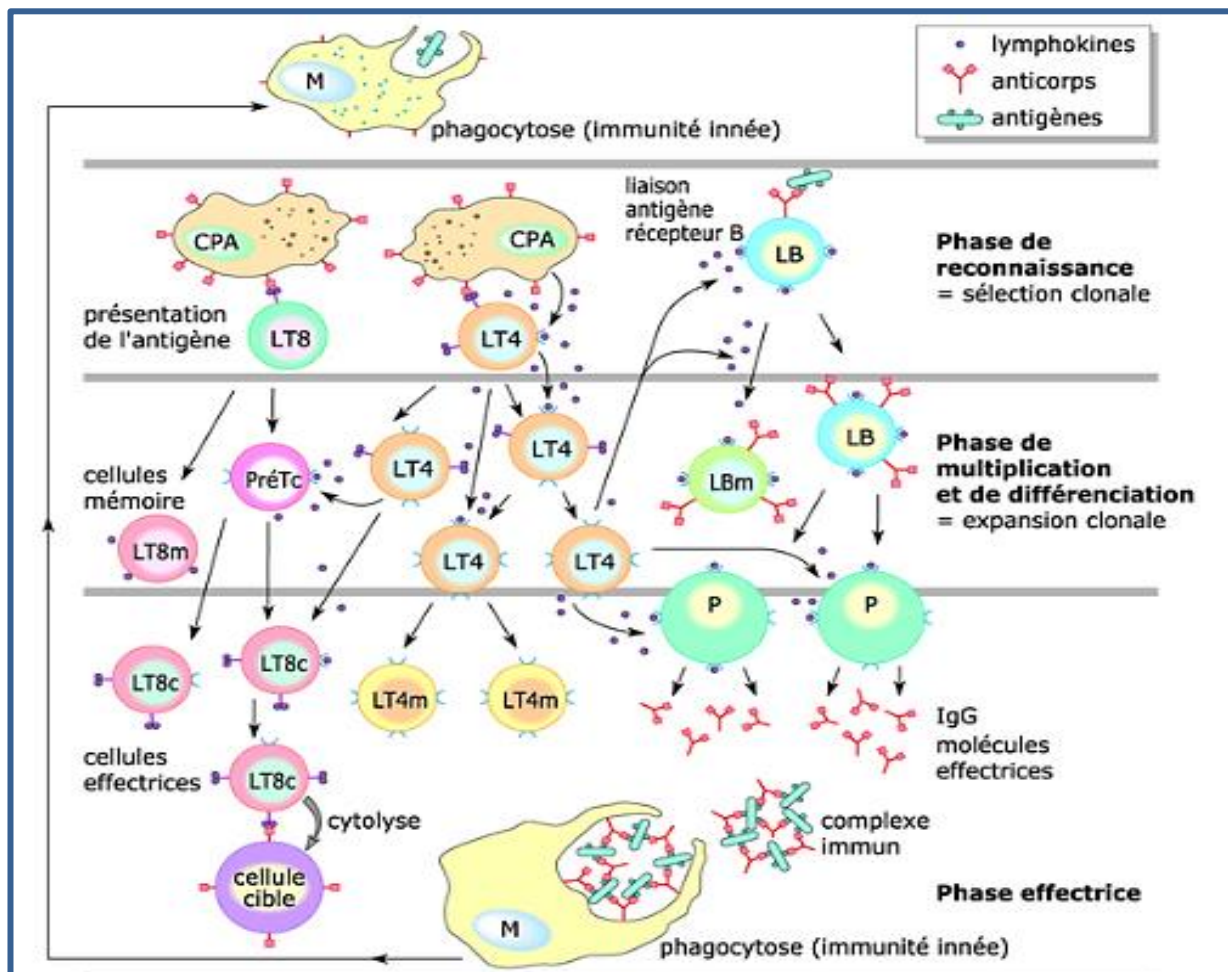


Figure 11 : Schéma de la réaction immunitaire (Lien 5).

II.1.2.1. Fonctions effectrices des Ig Gamma

Les *IgG* sont produites en abondance à la suite d'une infection ou à cause de la présence d'éléments étrangers dans l'organisme. Ils ont également la capacité de traverser les espaces extracellulaires et intracellulaires. La fixation de l'anticorps sur l'antigène à deux fonctions principales (Vidarson et al., 2014):

- le blocage de l'activité biologique de l'antigène (e.g. neutralisation d'une toxine).
- l'élimination de l'antigène grâce aux effecteurs immunitaires.

La première fonction des *IgG* est de se lier à l'antigène pour le neutraliser. Cette liaison s'effectue grâce au fragment $F(ab')_2$, qui correspond à l'association de deux fragments *Fab* reliés par une petite partie des parties constantes des chaînes lourdes. Les fragments *Fab* et $F(ab')_2$ ont la capacité de se lier aux antigènes mais le fragment $F(ab')_2$ le fait avec une plus grande affinité (Barbara et clarck, 1982) et met en jeu l'interaction entre le paratope de l'anticorps et l'épitope de l'antigène (Getzoff et al., 1988). Cette interaction non covalente implique entre 6 à 20 acides aminés et fait intervenir différents types de liaisons de faible énergie (forces de Van der Waals, électrostatiques, liaisons hydrogènes, groupements hydrophobes) (Milan et al., 1991).

La région *Fc* assure la deuxième fonction. Elle médie les fonctions effectrices des anticorps en activant des voies cytotoxiques dépendantes de cellules immunitaires et du complément. L'interaction entre le *Fc* et une protéine (*C1q*) du complément permet d'activer la cascade du complément, ce qui conduit à une cytotoxicité dépendante du complément (*CDC*), puis aboutit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire et à la lyse de la cellule cible (De Taeye et al., 2019). En parallèle, cette région recrute et active des cellules du système immunitaire, les cellules *NK* (*Natural killer*), les monocytes et les neutrophiles, qui expriment des récepteurs pour la région *Fc* des *IgG*, induisant ainsi une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (*ADCC*) et donc la lyse cellulaire (Figure 12) (Bejan et Alexandre 2019).

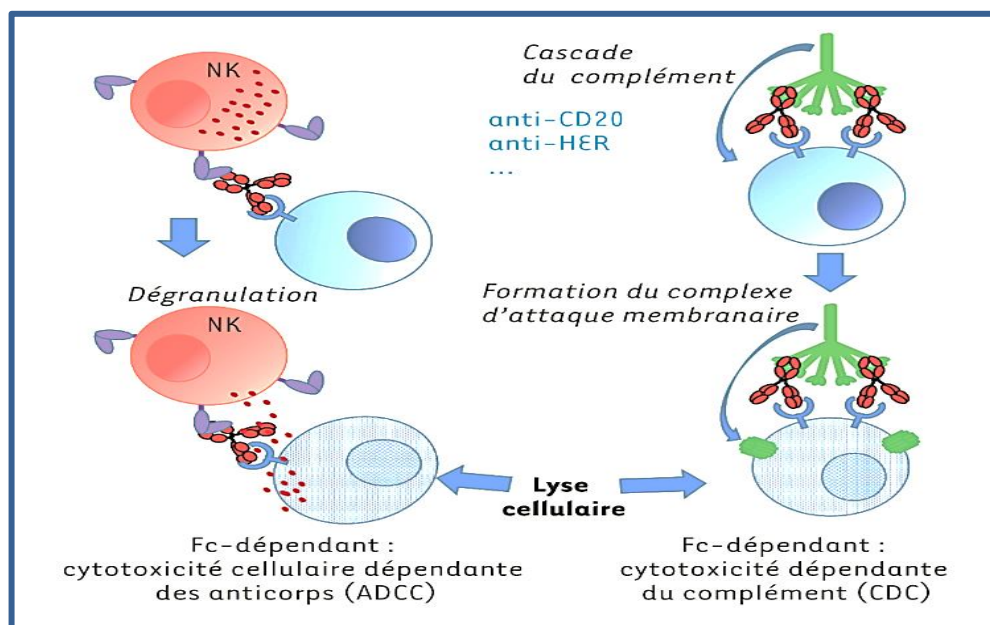


Figure 12 : Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique (Bejan et Alexandre, 2019).

II.2. La sérothérapie

II.2.1. Définition de la sérothérapie

La sérothérapie, immunisation artificielle passive ou thérapie sérique est l'utilisation thérapeutique du sérum sanguin, partie liquide infime du sang. Celui-ci est généralement d'origine animale, principalement du cheval (Prescott et al., 2014), vacciné contre une maladie infectieuse à l'aide de dose croissante d'antigène responsable de cette maladie (Alexandre, 2018). En vue d'obtenir des antitoxines permettant donc de neutraliser un antigène microbien, une bactérie, une toxine, un virus ou encore un venin (Demont, 2015).

II.2.2. Naissance de la thérapie sérique

La sérothérapie a représenté une étape majeure dans la lutte et le traitement des pathologies infectieuses. Elle apparut dans la seconde moitié du dix-neuvième siècle avec l'essor de la microbiologie et l'identification des maladies infectieuses, en parallèle des premiers essais de vaccination (Demont et Carnoy, 2016).

La thérapie sérique le vu le jour le 06 décembre 1890 à Berlin lorsque la publication des travaux d'Emil Von Behring et Kitasato « sur l'établissement de l'immunité contre la diphtérie et le tétanos chez les animaux » (Lebranchu, 2018). Histoire des anticorps thérapeutiques. Leurs travaux montrent qu'une immunisation passive avec des antis sérums contre la diphtérie pouvait

protéger contre ces maladies bactériennes, ce qui a pu sauver des millions de vie pendant la Grande Guerre. Ces deux grands promoteurs de la sérothérapie antidiphthérique, ont été rapidement et le sont jusqu'à présent présentés comme les sauveurs des petits enfants (Both et al., 2014).

En 1901, Behring a reçu le premier prix Nobel de physiologie et de médecine pour sa contribution au développement de l'immunisation passive et de la thérapie sérique, en rendant le DAT « *Diphtheria Anti-Toxine* » en tant que remède efficace contre la maladie. Il n'existe actuellement aucune alternative à ce sérum équin (Smith et al., 2017). D'ailleurs ce concept de neutralisation de toxines fut rapidement transposé au traitement des envenimations, par la préparation de sérums contre les venins de différentes espèces de serpent puis de scorpion, et à les employer avec succès, ce qui reste toujours vrai de nos jours (Watier, 2009).

II.2.3. Les sérums thérapeutiques

Les sérums thérapeutiques sont des médicaments biologiques, étiologiques d'origine équine les plus connus (Figure 13). Ils se présentent généralement sous forme de solution, ayant pour principe actif des immunoglobulines « Ig » de type « IgG » (Theakston et al., 2003).

Ils sont utilisés en vue de provoquer une immunité passive. Ces produits sont efficaces contre une seule maladie infectieuse parfaitement définie au plan microbiologique. Ils ciblent un unique agent et sa toxine, et pour lutter contre une autre bactérie, il faudra élaborer un autre sérum (Gachlelin et al., 2013).



Figure 13 : Prélèvement de sang sur un cheval dans une annexe de l'Institut de sérum (*Le cheval a été préalablement immunisé avec la toxine correspondante partiellement inactivée*). (1904) (Wagner, 2009).

II.2.3.1. Mode et voies classiques d'administration

L'administration se fait par injections sous-cutanées ou intramusculaires « IM ». Le choix du site d'injection est fondé sur l'importance de la masse musculaire ainsi qu'à l'importante vascularisation locale (Camara, 2006).

La diffusion de ce médicament dans le tissu sous-cutané ou dans le muscle permet aux molécules actives de ne pas être absorbées par l'intestin donc pas de contact avec les sucs digestifs, avec un effet interne et rapide (Leclerc, 2011).

L'injection est effectuée le plus tôt possible après l'exposition au microbe. L'action du sérum est de courte durée puisque ces anticorps sont peu à peu détruits par l'organisme. C'est pour cela qu'on effectue souvent par la suite une vaccination (Haut Conseil de la santé publique, 2011).

II.2.4. Etapes et techniques de production des sérums équins

La production d'immuns sérums suit un processus qui commence par l'immunisation des chevaux, les chevaux utilisés sont des chevaux de race commune, suivi de la ponction sanguine et le recueil de l'immun sérum, et se termine par l'étape de la purification du produit obtenu qui précède le conditionnement en formes galéniques (Figure 14) (Stellmann et al., 1969).

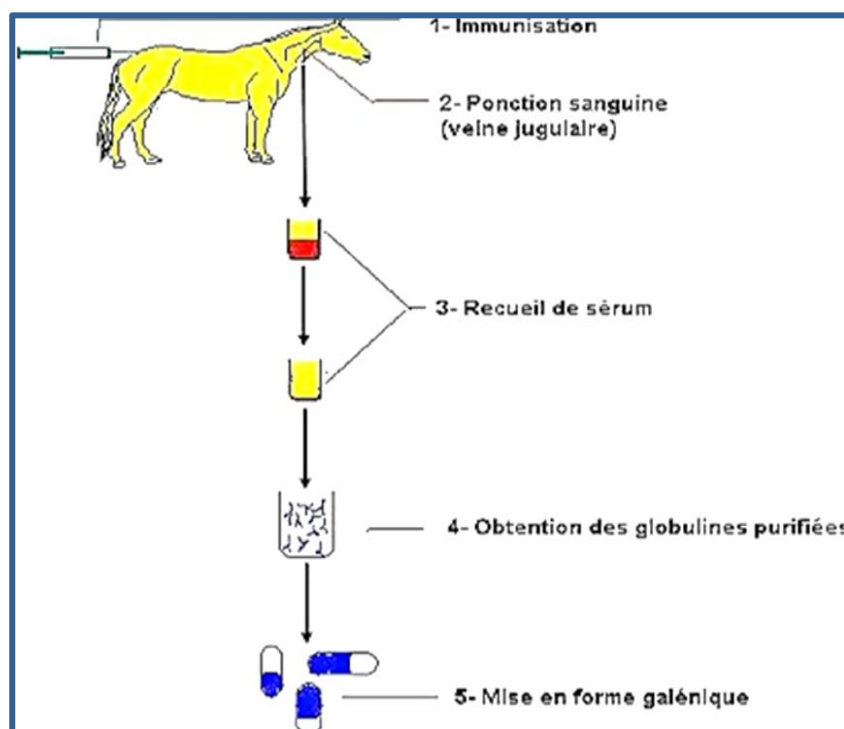


Figure 14 : Schéma général de production des sérums thérapeutiques (Tejiozem, 1983).

Ce processus comporte en tout quatre étapes :

II.2.4.1. Immunisation des chevaux

Identification des chevaux : Elle se fait par le renseignement d'une fiche d'identité de chaque cheval qui comporte des données telles : type d'animal, numéro attribué, numéro du transpondeur, nom de l'animal, spécialité qu'il produit, année de la première immunisation et années pendant lesquelles il a été traité, sexe, photo de l'animal. (Tejiozem, 1983).

Modalités d'immunisation : L'immunisation consiste à administrer, généralement par voie intraveineuse et de façon répétée chez le cheval des antigènes spécifiques « *Toxine Diphtérique* » aux anticorps à produire. Elle a lieu à des périodes précises de l'année dans le but d'assurer l'intégrité de l'animal (Tejiozem, 1983).

II.2.4.2. Obtention du sérum

Ponction du sang : La ponction est effectuée sous anesthésie locale, assurée par un vétérinaire. Le volume de sang récupéré dépend du poids et des données hématologiques de l'animal. Cette opération se fait dans des conditions stériles (Laraba et Hammoudi, 1999).

Récolte du sérum : Le sérum est séparé du sang par centrifugation, puis contrôlé par électrophorèse pour en déterminer certains pourcentages protéiques, et enfin recueilli dans des flacons stériles et conservé sous forme liquide à - 20°C (Tejiozem, 1983).

Analyses du sérum : Des analyses biochimiques (dosage des protéines totales, dosage albumine / globuline, pH. Etc.) et microbiologiques (recherche d'anémie infectieuses des équidés. Etc.) sont effectuées sur le sérum obtenu (Tejiozem, 1983).

II.2.4.3. Purification des immunoglobulines

Cette étape consiste à précipiter les immunoglobulines « Ig » dans le sérum obtenu en se débarrassant de l'albumine (Levieux et Bezard, 1974). Et parmi les différents protocoles de purification des immunoglobulines, la technique par précipitation aux sels d'ammonium est la plus répandue.

Protocole aux sels d'ammonium : Le pH du sérum est ajusté à 3,3 par ajout de l'acide acétique à 1,76 N. La prochaine étape consiste à précipiter les anticorps contenus dans le sérum en présence des sels d'ammonium (sulfate d'ammonium) (Figure15) (Laraba et Hammoudi, 1999).

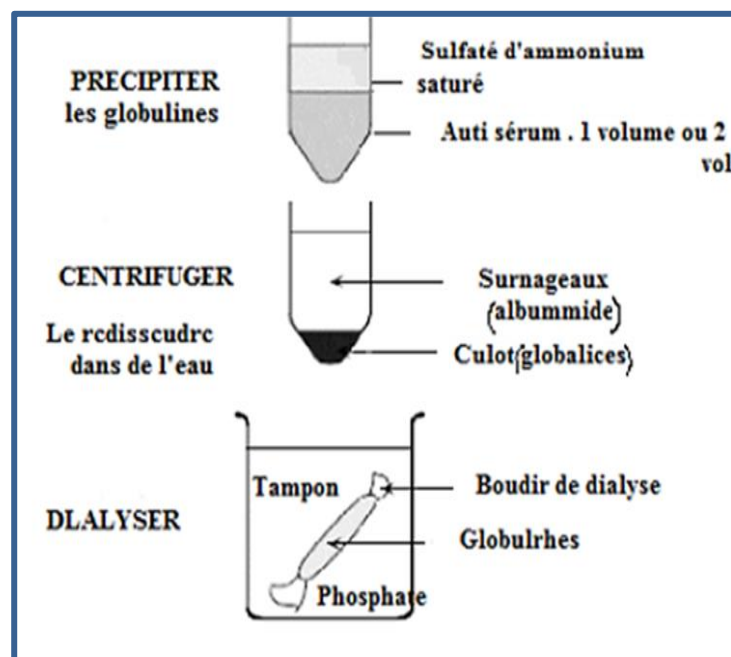


Figure 15 : Techniques de purification des immunoglobulines : précipitation par les sels (Tejiozem.1983).

La digestion des immunoglobulines précipitées, en présence de la pepsine, aboutit à l'obtention des fragments $F(ab')_2$ et Fc . La filtration qui suit permet d'éliminer le fragments Fc et en ne retenant que les fragment $F(ab')_2$ qui constituent le principe actif des sérums thérapeutiques (Cammeron et al., 2000).

II.2.4.4. Mise en forme galénique

La présentation galénique correspond à la présentation médicamenteuse optimale la plus adapté pour être utilisé chez un patient (Braussard et al., 2016).

L'aspect privilégié pour ces liquides thérapeutiques est l'état liquide, sous forme de solution dans des flacons en verre bien fermé, qui pourront être conservé au frais pendant une période approprié (Abdoulaye, 2018).

Le remplissage de ces solutions biologiques thermosensibles, demande des conditions aseptiques strictes avec haut respect des procédés validés et d'un personnel qualifié. Les points primordiaux a contrôlé sont décrit ci-dessous (Soubeyrand, 2018) :

- Le contrôles des locaux ; par le contrôle de l'atmosphère, notamment la température, humidité, air filtré stérilement, pressurisation.

- Le contrôle de l'environnement, afin d'éviter les manifestations de particules, flore microbienne ou autres agents étranger lors du remplissage.
- Les équipements doivent êtres nettooyables ou stérilisables.

La formulation et le mélange différentes valences tels des diluants, des stabilisants et des adjuvants sont ajoutés permettant ainsi d'obtenir un lot homogène de sérum final vrac, combinant. Il sera testé ultérieurement par le contrôle qualité pour toutes ses propriétés. Cette étape doit être rigoureusement contrôlée et validée afin de minimiser les risques de contamination (Soubeyrand, 2018).

Chapitre III :

Contrôle de qualité des sérums thérapeutique

III. Contrôle de qualité des sérums thérapeutique

III.1. Généralité sur le Contrôle de qualité

Le contrôle de qualité a constamment pris de l'importance ces dernières années, surtout dans le domaine du médicament. Aujourd'hui le terme « Qualité » devenue très utilisé dans plusieurs domaines, notamment dans le domaine du médicament (Guerra, 2008).

Jusqu'au début des années 60, la qualité des médicaments était orientée conformément aux documentations et l'utilisation est validée par des décisions et autorisations qui en permettront un usage réellement thérapeutique (WHO, 2013). D'après la réglementation de l'OMS, l'objectif principal du contrôle est d'étudier les propriétés du produit, d'évaluer les résultats et de rejeter les produits qui n'atteignent pas les normes (Sidébé, 2011).

III.1.1. Définition du contrôle

Selon la huitième édition de l'abrégé de pharmacie galénique, « le contrôle consiste à mesurer une ou plusieurs caractéristiques d'une entité et à comparer les résultats obtenus à des spécifications préétablies » (Le Hir (a), 2001).

III.1.2. Définition de la qualité

La «Qualité» peut se définir comme la capacité à atteindre les objectifs opérationnels visés. Selon *La norme ISO 8402-94* la qualité est définie comme suit : « Ensemble des caractéristiques d'une entité qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés et implicites » (Guerra, 2008).

La norme ISO 9000:2000 la définit comme ceci : « Aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences » (Balin et Giard, 2007).

Selon l'AFNOR comme étant : « l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire les besoins explicites ou implicites d'un client ou des utilisateurs » (Alioua, 2012).

Tous les auteurs semblent s'accorder sur le fait que la qualité se détermine, et s'évalue toujours par rapport à une référence Le contrôle de la qualité des produits est donc défini comme un élément essentielle qui détermine si le produit contrôlé est conforme ou non à ses spécifications ou exigences préétablies.

III.2. Contrôle des produits santé à la santé humaine

III.2.1. Caractéristique recherchée lors du contrôle des produits immunologiques

Les vaccins, toxines ou sérums considérés en étant des produits immunologiques, recouvrent les agents utilisés en vue de provoquer une immunité, en vue de diagnostiquer l'état d'immunité, et en vue de provoquer une immunité passive (Fabre, 2008). La qualité d'un médicament immunologique est évaluée par la présence des critères et des caractéristiques indispensables énoncées ci-dessous (Sidébe, 2011) :

- ❖ L'emballage et la notice doivent contenir ; L'identité, la dose, l'effet indésirable des constituants du médicament, le principe actif, l'excipient et l'adjuvant.
- ❖ La pureté ; qui désigne l'absence de substance toxique.
- ❖ Chaque lot doit être constant en matière d'uniformité de sa forme, sa couleur, sa taille, et de son poids (doivent être constant dans un même lot ou d'un lot à l'autre).
- ❖ La date de péremption doit figurer de façon explicite, au-delà de laquelle le fabricant ne garantit plus l'efficacité et l'innocuité du médicament.

III.2.2. Contrôle de qualité des produits immunologiques en Algérie

L'état algérien ne produit pas tous les médicaments immunologiques qu'il exploite dans ses programmes de vaccination, ou de traitement (Djelouat et Lahlou, 2018).

Même si ces produits biologiques importés sont en priorité sous la responsabilité du fabricant, et leur garantie est assurée par les services d'homologation du pays de fabrication. Le pays importateur doit quand même s'assurer que l'activité, l'innocuité et l'efficacité de ces produits en question correspondent parfaitement aux normes nationales (Houari, 2017).

L'autorité nationale est chargée donc d'examiner et d'évaluer les informations sur tous les produits avant d'accorder l'autorisation de l'AMM de mise sur le marché dans le pays. Ces examens concernent différents l'aspect (Andiollo et al., 1997).

III.2.2.1. Autorisation de Mise sur le marché (AMM)

L'AMM est décrit comme étant un agrément de commercialisation nationale délivré par la commission d'autorisation et d'accréditation de mise sur le marché des médicaments à usage humain. Cette commission est sous l'autorité de sécurité sanitaire de la santé publique. Elle est

notamment consultée par le ministre de la santé sur l'intérêt thérapeutique, l'efficacité et l'innocuité des médicaments nouveaux (Pebret, 2004).

III.2.3. La Pharmacopée

La Pharmacopée est un ouvrage de référence du pharmacien industriel, unique en matière de contrôle qualité des médicaments au sein des pays signataires de la convention relative à son élaboration. Elle fournit et établit les règles et restrictions à respecter lors de la fabrication ou du contrôle de produits à usage humain ou vétérinaire grâce à des spécifications communes reconnues (Franck, 2008).

Ces spécifications participent à la protection de la Santé publique, et ne sont que les minimas requis pour valider la qualité de la matière ou du médicament en question. Ces normes officielles doivent être suivies pendant les processus de développement, de production et de commercialisation (Pont, 2011).

Elle est composée de monographies ; sorte de guide qui tient compte de l'élaboration et l'utilisation d'immunosérums pour usage humain, aussi bien générales que spécifiques (Europe-DEQM-Direction et al., 2014), qui sont détaillées les différences ci-dessous.

III.2.3.1. Structure et contenu de la monographie générale d'immunosérums d'origine animale pour usage humain

Les dispositions de la monographie générale Immunosérums d'origine animale pour usage humain s'appliquent à tous les immunosérums d'origine animale pour usage humain.

La monographie générale est dite générale mais présente de façon détaillée les exigences et les points qui doivent être pris en considération par les fabricants pour la préparation (production) ou le contrôle des lots de tous les immunosérums finis (Européenne Pharmacope, 2019).

a. La production

- Dispositions générales

Cette section décrit à la fois un ensemble d'exigences et d'autres aspects du processus de fabrication, pouvant par exemple être liés aux matières premières, au processus même de fabrication et à sa validation, à son contrôle, aux essais en cours de production (Européenne Pharmacope, 2019).

- Animaux

Cette section décrit les exigences relatives à la sélection, à l'hébergement, à l'alimentation, au contrôle sanitaire et à la surveillance des animaux utilisés pour la production d'immunosérums (Europenne Pharmacope, 2019).

- Immunisation et la purification

Cette section décrit la préparation des antigènes utilisés pour immuniser les animaux, la procédure d'immunisation et les méthodes chimiques ou physiques utilisées pour purifier les immunoglobulines et les approches permettant d'éviter la contamination du produit (décrite dans le chapitre 2).

- Vrac final

Désigne le produit final (l'immunosérum obtenu après purification) en récipients scellés provenant de la même récolte. Chaque lot doit être identifié par un code. L'étiquetage doit être précis et informatif. La monographie générale décrit également, si un conservateur antimicrobien est ajouté dans le vrac final, sa teneur doit être déterminée (Europenne Pharmacope, 2019).

- Lot final

La dénomination « lot final » s'applique au vrac final réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable. Seul le lot final satisfait à chacun des essais décrits (Europenne Pharmacope, 2019).

b. Identification

L'identification se définit par la vérification, avec un niveau d'assurance acceptable, que le produit est conforme à la description figurant sur l'étiquette (Europenne Pharmacope, 2019).

c. Essai

L'essai consiste à une série de tests :(la teneur en conservateur, en protéine, en excipients, en eau, en stérilité. Etc.). Le produit doit être conforme notamment aux exigences pendant toute sa durée de conservation (Europenne Pharmacope, 2019).

d. Activité

Le contrôle d'activité est la capacité du sérum à produire des effets qui reflète son pouvoir immunogène. La vérification de l'activité est mis en œuvre par des essais *in vitro*, la monographie spécifique précise comment l'effectuer (Europenne Pharmacope, 2019).

e. Conservation

Les conditions de conservations (Température, à l'abri de la lumière .Etc.) des immunosérum sont notamment décrites par une monographie (Europenne Pharmacope, 2019).

III.2.4. Méthodes générales d'analyse des sérums thérapeutiques finis

Ces produits immunologiques sont soumis à des examens spécifiques pratiqués sur chaque lot du lot final, afin de vérifier l'identité, l'activité, la sécurité microbiologique et biochimique (Mondial de la santé, 2013) :

❖ Les examens quantitatifs

Ces examens consiste a mesuré mesurent la quantité d'un composant présent dans l'échantillon, de manière précise et juste. Ces mesures fournissent une valeur numérique, exprimée dans une unité de mesure particulière (e.g. Dosage de solutés, dosage des protéines totales, ainsi que les différents tests physico-chimiques).

❖ Les examens qualitatifs

Cela désignent en effet la présence ou l'absence d'une substance, ou évaluent les caractéristiques telles que la morphologie. Les résultats ne sont pas exprimés en valeur numérique mais en termes qualitatifs tels que « positif » ou « négatif » ; « normal » ou « anormal » ; « croissance » ou « pas de croissance » (e.g. les examens microscopiques, examens sérologiques pour la recherche de la présence ou non d'antigènes et d'anticorps, examens microbiologiques).

Chaque méthode d'analyse possède un certain nombre de propriétés caractéristiques et de critères qui qualifiaient les performances de la méthode à savoir : l'exactitude, la précision, la répétabilité, la reproductibilité, la robustesse, la linéarité, la sensibilité, la capacité de détection et enfin la sélectivité (WHO, 1998). En se référant aux normes en vigueurs de la Pharmacopées, les caractéristiques les plus importantes pour établir la qualité d'un immunosérum sont :

III.2.4.1. Contrôle de l'étiquette

L'étiquette constitue la carte d'identité de chaque médicament. Elle comporte les éléments fondamentaux ci-après (Sidibé, 2011) :

- le nom du médicament.
- la composition, la forme galénique, la quantité du produit dans le récipient.
- le numéro du lot de fabrication.
- les dates de fabrication et d'expiration.
- les conditions de conservation et de manutention du médicament si cela s'avère nécessaire.
- les instructions et précautions pour le meilleur usage du médicament.
- l'adresse complète du fabricant en indiquant surtout le lieu et le pays d'origine.

III.2.4.2. Test d'apparence

Par apparence, ces produits sont des liquides transparents, observé par inspection visuelle (Houari, 2017). Les solutions doivent être limpides et ne renferme pas de particules ou débris visibles à l'œil nu (Baxerres, 2014) ; elle doivent avoir ainsi un aspect homogène et ne présente pas de séparation des phases (Hallouët et al., 2019).

Le produit injectable est examiné alors, à son apparence à la lumière du jour en notant sa couleur, sa clarté, son opalescence ou sa nébulosité, ainsi que la présence éventuelle de particules (Houari, 2017).

III.2.4.3. Contrôle du volume

Il s'agit des essais pour vérifier l'uniformité de la masse totale ou le volume total extractible du liquide immunothérapeutique contenue dans les boites d'un lot (European Pharmacopoeia, 2014).

III.2.4.4. Tests physico-chimiques

a. Le dosage des protéines totales

De nombreuses méthodes de dosage colorimétrique des protéines présentent chacune des caractéristiques différentes (Guillou et al., 1986). Elles sont basées sur la réaction d'agents chromophores avec les liaisons peptidiques ou avec certains acides aminés des protéines, les

plus célèbres sont la méthode Biuret, Bradford, Lowry. Etc. Le choix d'une méthode dépend donc du contexte (Zheng et al., 2003).

b. Dosage des conservateurs

Les conservateurs sont des substances utilisées pour protéger un produit altérable en l'occurrence les sérums. Les conservateurs sont utilisés afin maintenir l'asepsie. La plupart des produits destinés aux pays en voie de développement sont formulés dans des flacons multi dose (Sharma et al., 2008).

Les plus trouvés dans les immuno-liquides sont les crésols et les phénols (Figure 16) (Amies, 1941).

- **Le phénol**

Le phénol ou le « hydroxybenzène » est un cristallin incolore, soluble dans l'eau et solvants organiques, et comporte plusieurs dérivés. Le phénol est synthétisé à l'échelle industrielle par extraction à partir du charbon goudron et est également obtenu dans une réaction entre le chlorobenzène et l'hydroxyde de sodium. Cette substance est polyvalente en matière d'utilisation car elle est utilisée comme désinfectant et réactif dans analyse chimique, comme pesticides, colorants et de textile. À la dose de 1 g de phénol peut être mortelle pour un homme adulte (Michalowicz et al., 2007).

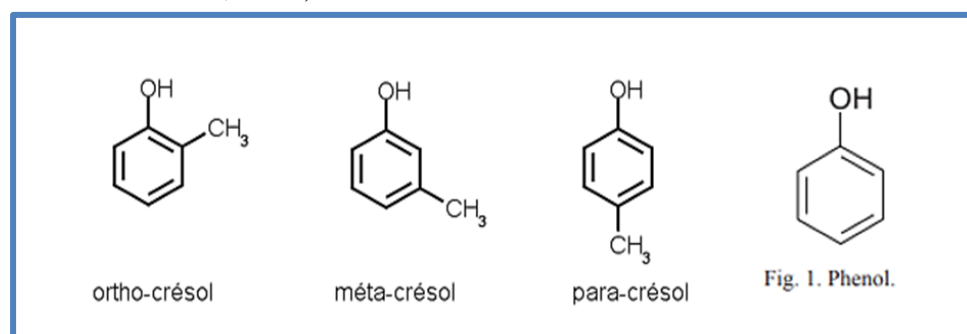


Figure 16 : Structure chimique du phénol et les isomères du crésol (Michalowicz et al., 2007).

- **Le crésol**

Le crésol « synonymes : crésylol, acide crésilique, tricrésol » est le dérivés alcalins du phénol, constitué d'un mélange variable de trois isomères du méthyl-phénol de la formule (CH₃-C₆H₄OH), dont le substitut " méthyl " est placé en position ortho-, méta- ou para-. Il présente notamment une toxicité élevée à certaine concertation (Fatihi et al., 2018). Le dosage des

crésols et des phénols est déterminé par spectrophotométrie, selon une méthode colorimétrique (Ali et al., 2018).

c. Dosage de l'osmolalité

L'osmolalité est définie par la quantité de particules osmotiquement actives contenues dans une solution. En pratique, ce test est une façon globale de mesurer la contribution des différents solutés présents dans une solution. En résumé l'osmolalité peut être estimée aux concentrations de principaux constituants dissous du sérum (Khrajria et al., 2005).

L'osmolalité d'un solvant pur est nulle car elle ne contient aucun soluté. L'ajout d'une mole de particules osmotiquement actives à un kilogramme de solvant entraîne la formation d'une solution osmole censée contenir 1 osm / kg d'eau ou 100 mosml/ Kg d'eau (Gernnari, 1984).

La mesure de l'osmolarité se fait par un appareil appelé « Osmomètre ». Il comprend un système de refroidissement du récipient de mesure, un système de température constitué d'une résistance variable avec la température et muni d'un dispositif approprié de mesure du courant ou de la différence de potentiel qui peut être étalonné en abaissement en température ou en osmolarité, et d'un système d'agitation permettant l'agitation du prélèvement (Figure 17) (European Pharmacopoeia, 2014).



Figure 17 : Appareil de mesure d'osmolarité « Osmomètre » (Lien 6).

d. Test de pH

La stabilité du pH des fluides présents ou introduits dans les organismes vivants est essentiel au maintien de sa stabilité interne dont l'importance de réguler le pH des solutions avant l'injection (Kotz et Treichel, 2006). Le pH « Potentiel d'hydrogène » est le coefficient qui détermine l'acidité ou la basicité d'une solution aqueuse. Selon l'échelle de 0 à 14 la nature de l'échantillon peut être définie (Bremaud et al., 2006)

Ce test utilise un appareil appelé un pH-mètre, un voltmètre électronique digitale directement étalonné en pH (Mendham, 2005). Il est constitué d'électrodes de référence en verre et en calomel standardisé, avec des solutions tampons standard à pH 5,0 et 7,0. Les électrodes sont rincées à l'eau distillée, séchées et le pH de la solution d'essai enregistré (WHO, 1977).

III.2.4.5. Test d'innocuité

Les essais sur l'animal de laboratoire « *in vivo* », le jeune rongeur en croissance le plus souvent, permettent d'avoir, lorsqu'ils sont bien pratiqués et dans des temps assez courts de quelques semaines, une évaluation précise de la qualité du produit inoculé (Besançon, 1995). Les tests d'innocuité définissent les tests de toxicité sur des animaux expérimentaux en l'occurrence les souris et les cobayes. Une dose humaine (1,0 ml) est injectée par voie intrapéritonéale dans cinq souris adultes pesant 17-22 g, mais pas plus de (5,0 ml) dans deux cobayes pesant 250-350 g (WHO, 1977).

III.2.4.6. Essai de stérilité

Cet essai est destiné au contrôle de l'absence d'agents microbiens contaminants (bactéries aérobies et anaérobies, et champignons). Il est réalisé dans des conditions permettant d'éviter les contaminations microbiennes et d'assurer la sécurité microbiologique (Garin, 1992).

La recherche de micro-organismes proposée par la documentation en l'occurrence la pharmacopée (Hygis, 1998) est basée sur la mise en culture dans des conditions « universelle » en milieu liquide (Dupin, 1992). La présence éventuelle d'un intrus microscopique se matérialise par l'apparition, après incubation à une température et une durée déterminées, d'une turbidité dans le milieu de culture (Palya, 1992). Les milieux utilisés sont les milieux Soybean Casein (Annexe 2) et les milieux au Thioglycolate (Annexe 3) (WHO, 1977).

III.2.4.7. Test d'identité

Les tests d'identité se font sur un lot d'anatoxine, par des méthodes *in vitro* (Collins et al., 1997). Ces procédures d'identité de l'anatoxine liquide sont simples, et effectuées par un test de floculation (WHO, 1977) ou par un test d'immunodiffusion.

a. Test de floculation

Le test de floculation est appelé « le test de Ramon ». C'est un test qui consiste à détecter un complexe formé entre l'antigène et l'anticorps présent dans une solution immunologique. Ces résultats sont observés à l'œil nu (Figure 18) (formation d'une flotte) puis par la mesure du Lf/ml (WHO, 2013).

L'indice de floculation (Lf) est l'unité de mesure qui exprime la teneur en toxine ou anatoxine dans un échantillon en utilisant le titrage de Ramon (Bayne, 1924).

Une floculation se produit au point d'équivalence toxine/anatoxine dans un ou plusieurs tubes (Lyng et al., 1990).

La valeur Kf est le temps en minute de l'apparition de floculation, le premier tube à floculer est utilisé comme référence pour déterminer la valeur Lf (indice de floculation) de l'échantillon, plus le Kf est grand plus la concentration ou la qualité de l'antigène ou de l'anticorps est faible (Gauriat, 2012).

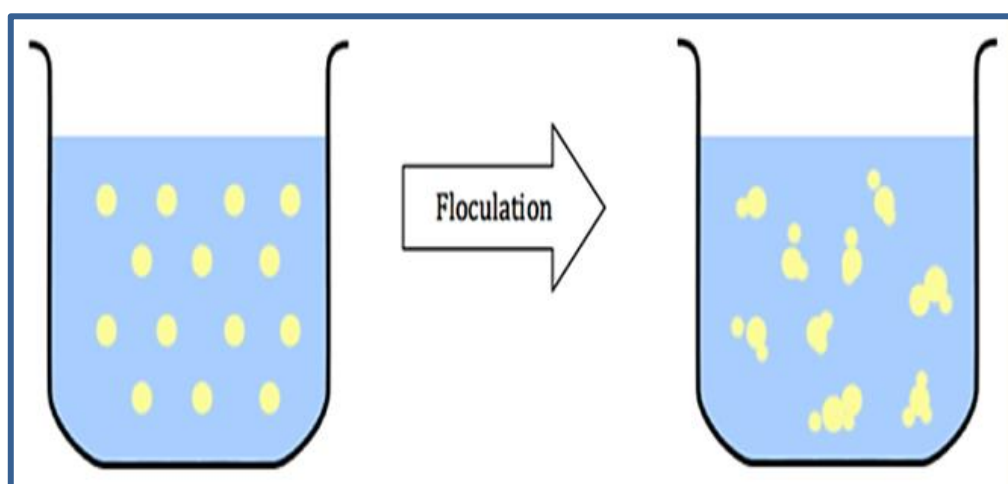


Figure 18 : Principe simplifié de la floculation (Lien 7).

b. Test d'immunodiffusion

Ce test définit la capacité de antigènes « anatoxine » et des anticorps en l'occurrence les « antitoxines » à diffuser à partir de deux réservoirs séparés. La lecture s'effectue par formation de lignes de précipitation appelée « Arc de précipitation », leur apparition signifie qu'un complexe anticorps/antigène s'est formé (Figure 19) (Chevelon, 2015). Parmi les méthodes d'immunodiffusions ; l'électro synérèse, la méthode de Ouchterlony.

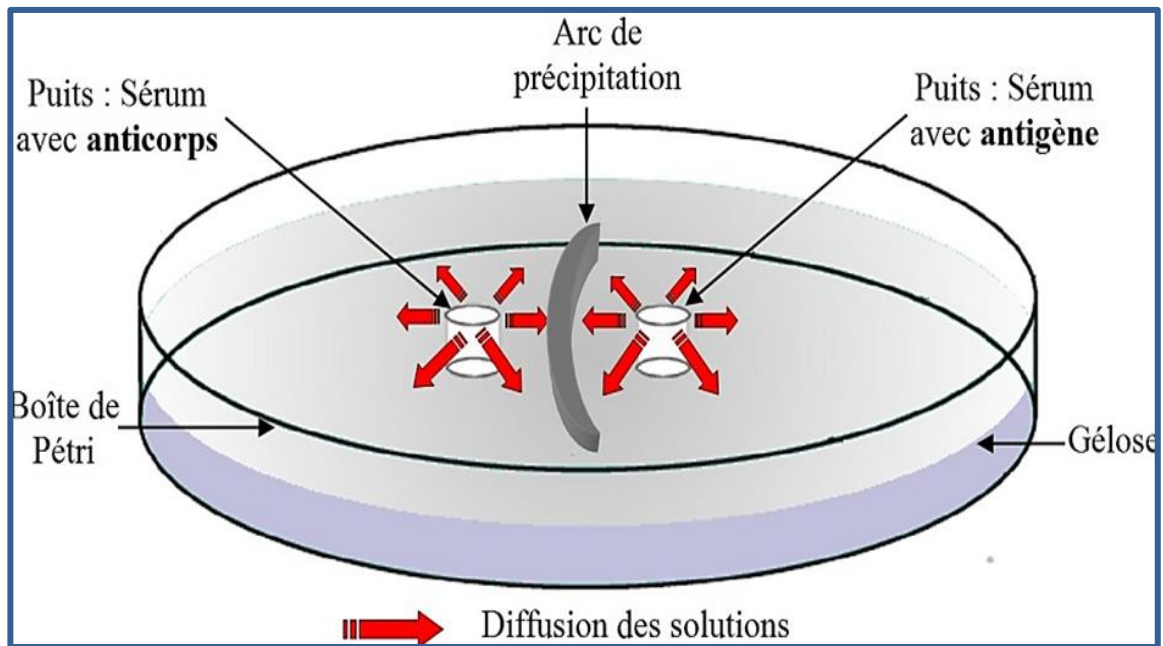


Figure 19 : principe de l'immunodiffusion sur gel d'agarose (Chevelon, 2015).

Partie 2 :

Partie expérimentale

Chapitre IV :
Matériels et méthodes

IV. Matériels et méthodes

IV. 1. Présentation générale de l'institut Pasteur d'Alger

L'Institut Pasteur d'Alger a été fondé en 1894 pour traiter les personnes atteintes par la rage. Son nom change à partir de décembre 1909, pour devenir l'Institut Pasteur d'Algérie, représentant au niveau national un centre de recherche et une référence importante pour toutes les questions relatives aux maladies infectieuses touchant l'homme ou les animaux (Lien 8).

Il reste une filiale de la fondation « Institut Pasteur de Paris » jusqu'en 1962 et devient en 1971 un institut algérien créé par l'ordonnance n°71-45 du 21 juin 1971. En 1994 son statut pour devenir un Etablissement Public à caractère Industriel et Commercial (EPIC), sous tutelle du Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière. Il fait partie du Réseau International des Instituts Pasteur, qui comprend 33 Instituts Pasteur à travers le monde (Lien 8)

Le siège social de l'Institut se trouve à Delly Ibrahim (Alger) (Figure 20) sur une assiette de 30 hectares. Il est constitué de plusieurs départements, contenant à leurs tours de différents laboratoires (Lien 8).



Figure 21 : Entrée de l'institut pasteur d'Alger, Delly Brahim (Lien 8).

➤ Département Contrôle des Produits Biologiques

Le Département de contrôle des produits biologiques a pour mission de promouvoir les activités scientifiques des laboratoires correspondants, comme la coordination de la gestion des

activités de contrôle analytiques pour le laboratoire de contrôle qualité. Il supervise notamment les activités de contrôle des produits suivants (Lien 8) :

- Produits répartis fabriqués par l'IPA.
- Produits finis fabriqués par l'IPA.
- Certains paramètres in process de la production de l'IPA.
- Produits finis Importés par l'IPA.

Les produits biologiques concernés sont les vaccins, les sérums thérapeutiques, les produits de diagnostic *in vivo* et *in vitro*, ainsi que d'autres produits biologiques.

➤ Laboratoire de contrôle de Qualité

Le laboratoire de contrôle de qualité assure les activités de diagnostic, de formation et de recherche. Il est composé de 5 unités ; une unité physico-chimie, unité cultures cellulaires, unité microbiologie, unité immunochimie et une unité pharmaco-toxicologie.

L'objectif de l'étude

C'est une étude prospective analytique, qui a pour objectif de voir les différents contrôles et essais effectués, et vérifiés sur l'exemple de certains de sérum antidiphtérique ayant réussi les tests de contrôle et qui sont conformes aux exigences sollicitées.

IV.2. Matériels utilisées

Pour la réalisation de l'étude du contrôle du sérum antidiphtérique importé, on eu recours a l'utilisation des paillasse de différents unités ainsi qu'aux :

- Equipements de chaque unité (Annexe 4).
- Réactifs et colorants (Annexe 5).
- Des flacons sérum Antitoxine Diphtérique B.P importé (Annexe 6).
- Milieu de culture (unité de microbiologie) (Annexe 7).

Les différents tests utilisés dans chaque unité dans le laboratoire de contrôle de qualité sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 01 : Les tests utilisés dans le laboratoire de contrôle de qualité.

Unité	Test
Physico-chimie	Test biuret
	PH
	Volume extractible
	Dosage de crésol
Stérilité	Milieu Thioglycolate
Immunochimie	Test d'Ouchterlony
Pharmaco-toxicologie	Contrôle de la toxicité anormale

IV. 3. Méthodes utilisées

IV.3.1. Tests physico-chimiques

IV. 3.1.1. Méthodes dosage des protéines totales par la méthode de biuret

➤ Principe

Développée par [Gornall](#) en 1949, la méthode du biuret permet d'obtenir un dosage rapide des protéines. En milieu alcalin, les ions de cuivre (Cu^{2+}) réagissent avec les liaisons peptidiques des protéines et forment un complexe pourpre caractéristique avec coloration violette photométrique ([Louis, 1951](#)), comme explique symboliquement ci-dessous.



Le nombre de liaisons peptidiques appelé aussi la concentration en protéines (C), déterminent l'intensité de cette coloration. Cette même intensité est mesurable en termes de densité optique (DO) par un spectrophotomètre à une onde de 540 nm : c'est ce qu'on appelle « dosage colorimétrique » où la DO est fonction de la concentration selon la loi de Beer-Lambert : $\text{DO} = f(C)$.

➤ Mode opératoire

* Une Gamme d'étalonnage a été faite au préalable en utilisant la solution de référence bovine sérum albumine BSA (10mg/ml par solution de chlorure de sodium à 9g/L). La solution obtenue est dilution en 3 concentrations (Tableau 2).

Tableau 02 : Les concentrations des solutions étalons.

Concentration mg/ml	10	5	1	0.5
Dilutions	0	1/2	1/10	1/20

* Dans un bécher de 100 ml, diluer la solution à examiner dans une solution de chlorure de sodium R à 9 g/L. L'échantillon est dilué au 1/5ème (1 ml de l'échantillon + 4 ml de l'eau physiologique) la quantité préparée doit suffire pour 3 tubes à essai.

* Aligner sur un portoir 5 tubes à essai en verre aux différents réactifs (NaOH à 6% ([Annexe 8](#)) puis la solution de biuret ([Annexe 9](#)) seront ajoutés à l'aide d'une micropipette de 1 ml de façon ordonnée (Tableau 3).

* Le Standard est une solution référence, contient de la bovine sérum albumine BSA à 1% (10mg/ml) déjà préparée ([Annexe 10](#)).

* Le Sérum (S) : est la solution à examiner.

Tableau 03 : Remplissage des tubes avec les différentes solutions pour dosage des protéines totales.

	Blanc	Standard	S1	S2	S3
Eau physiologique (ml)	1	0	0,5	0,5	0,5
BSA (1%) (ml)	0	1	0	0	0
DTA dilué (ml)	0	0	0,5	0,5	0,5
NaOH à 6% (ml)	1	1	1	1	1
Biuret (ml)	4	4	4	4	4

- Agiter avec le vortex les 5 tubes.
- Incuber pendant 30 min à l'abri de la lumière.
- Mesurer la DO à une onde de 545 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

➤ Lecture

- Lire l'absorbance des solutions étalons (Figure 21).
- Tracer la courbe d'étalonnage par le spectrophotomètre (l'absorbance de référence en fonction de la teneur en protéines de ces solutions).
- Calculer le coefficient de corrélation.

- Déterminer la concentration de l'échantillon à examiner à partir de son absorbance et de la courbe d'étalonnage.



Figure 21 : Lecture de l'absorbance par spectrophotomètre pour le dosage des protéines
(Photographie originale)

IV.3.1.2. Mesure du pH

Le potentiel Hydrogène (pH) est un coefficient qui caractérise l'acidité ou la basicité d'une solution. Une solution est acide si son pH est inférieur à 7, basique si son pH est supérieur à 7, et neutre à pH 7.

➤ Principe

Le pH des immunosérums thérapeutique est mesuré par un appareil spécial appelé un pH-mètre ; qui est constitué d'un boîtier électronique qui affiche la valeur du pH et une électrode qui mesure cette valeur (Cariou, 2007).

➤ Mode opératoire

* L'appareil est étalonné avant de commencer la mesure, en introduisant l'électrode dans une solution de référence (solution tampon) de pH 7, pH 4, ensuite par un pH 9 (rincer avec de l'eau distillé et essuyer l'électrode après chaque mesure).

* Une quantité de 3ml de l'immunosérum thérapeutique est extraite par une seringue de 5ml et mit dans un tube en verre.

*L'électrode du pH-mètre est rincer et essuyer puis tremper dans la solution à mesurer (Figure 22).



Figure 22 : Mesure du pH du sérum antidiphtérique par un pH-mètre 2007 (Photographie originale).

➤ **Lecture**

- Attendre quelques secondes le temps que l'appareil se stabilise et affiche le pH final.

IV. 3.1.3. Volume extractible

Le volume extractible est un test pour vérifier la masse totale ou le volume total extractible du liquide immunothérapeutique contenue dans les boîtes d'un lot (European Pharmacopoeia, 2014).

➤ **Principe**

Vérification si le volume indiqué sur la boîte de l'antitoxine Diphtérique importé est bien celui contenu dans le flacon (WHO, 2013).

➤ **Mode opératoire**

* Préparer 3 flacons du sérum injectable contenant 10 ml (volume nominale).

* Agité les flacons, jusqu'à s'assurer de l'homogénéisation des composants à l'intérieur.

* Prendre un volume de 30 ml à l'aide d'une seringue de 10ml de sérum thérapeutique de 3 flacons.

* Expulser toute bulle d'air de la seringue sans vider l'aiguille dans un cylindre sec normalisé (éprouvette de 50 ml) d'une taille telle que le volume à mesurer occupe au moins 40% de son volume gradué.

* Mettre les liquide dans une éprouvette graduée de 50 ml.

➤ **Lecture**

- Lire en mettant l'éprouvette sur un support stable.

IV. 3.1.4. Dosage de crésol

Le crésol est un composé aromatique, de formule C_7H_8O . Il est constitué d'un cycle benzénique substitué par un groupe hydroxyle (phénol) et un groupe méthyle (toluène). Il a un rôle de conservateur utilisés comme additif alimentaire ainsi que dans les produits cosmétiques et d'hygiène (Amiot et al., 1989).

➤ **Principe**

Ce test est utilisé pour décrire le dosage du crésol dans les immunosérums thérapeutiques à l'aide d'un spectrophotomètre. Les phénols donnent avec la 4-aminoantipyrine et le ferricyanure de potassium une coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle à la concentration.

➤ **Mode opératoire**

Dans un bécher de 250 ml, diluer la solution a examiné dans solution de chlorure de sodium R à 9 g/L. L'échantillon est dilué au 1/50ème (1 ml de l'échantillon + 49 ml de l'eau physiologique) la quantité préparer doit suffire pour 3 tube a essai (3 x 1/50ème) :

* Aligner sur un portoir 5 tubes a essai en verre au quelles différents réactifs ; solution alcaline tamponnée à pH 9,8 (Annexe 11), solution de 4-aminoantipyrine (Annexe 12), solution de Ferricyanure de potassium (Annexe 13), et une solution de phosphate mono potassique KH_2PO_4 (Annexe 14) seront ajouter a l'aide d'une micropipette de 1ml de façons ordonner (Tableau 4).

* Le Standard est une solution préparé avec de Tri-crésol (Annexe 15).

* Le Sérum (S) : est la solution à examiner.

Tableau 04 : Remplissages des tubes avec les différentes solutions pour le dosage du crésol.

En ml	Blanc	Standard	S1	S2	S3
Eau physiologies 9 g/l	6	5	5	5	5
Solution Tri-crésol	0	1	0	0	0
Solution DTA diluée	0	0	1	1	1
Solution alcaline tamponnée à 9,8	1	1	1	1	1
Solution de 4- aminoantipyrine	1	1	1	1	1
Solution de Ferricyanure de potassium	1	1	1	1	1
Solution de phosphate monopotassique	1	1	1	1	1

*Agiter avec le vortex les 5 tubes.

*Incuber pendant 10 min à l'abri de la lumière.

*Mesurer la DO à une onde de 506 nm a l'aide d'un spectrophotomètre.

➤ Lecture

- Lire les absorbance de la solution de référence et celle de la solution a examiné.
- Calculer la concentration en crésol de l'échantillon à partir de son absorbance et de la courbe d'étalonnage.

IV .3.2. Test de stérilité

IV.3.2.1. Incubation sur milieu thioglycolate

Les lots de produits biologique notamment les substances d'origine animal sont soumis a un test de stérilité obligatoire pour s'assurer de leur innocuité microbiologique ([Baharsefat et al., 1976](#)).

➤ Principe

L'épreuve de stérilité s'effectue sur l'échantillon à examiner en conditions aseptiques sous une hotte à flux laminaire afin d'éviter toute contamination accidentelle durant l'essai ce qui donnerait des lectures faussement positives ([WHO, 2013](#)).

➤ Mode opératoire

- **Préparation du milieu liquide au thioglycolate**

Le protocole de préparation a été décrite par Pittman en 1976 ([Pittman et al., 1976](#))

- Mélanger dans une fiole de 1L, la L-cystine, le chlorure de sodium, le D-glucose, la gélose, l'extrait de levure et les peptones pancréatiques de caséine avec l'eau et chauffer jusqu'à dissolution complète.
- Ajouter l'acide thioglycolique.
- Passer sur un filtre grossier la solution encore chaude et ajouter la solution de résazurine (indicateur d'oxydation).
- Répartir 10 ml de la préparation dans des tubes appropriés fermés
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 min (Figure 23).



Figure 23 : Aspect du milieu liquide au thioglycolate préparé (Lien 9).

Ensemencement

- Nettoyer soigneusement l'extérieur du sérum (flacons et bouchon) par de l'alcool.
- Ensemencer 0,5 ml des solutions à examiner dans 5 tubes contenant le milieu sous hôte en aérobiose.
- Incuber pendant 7 jours à 35 -37°C, un tube de référence contenant que le milieu est incubé notamment.

➤ Lecture

- La lecture se fait après la fin de l'incubation à l'œil nu.

IV.3.3. Test d'identité

IV. 3.3.1. Méthode d'Ouchterlony « technique de double diffusion en gel »

La méthode de double diffusion en gel d'Ouchterlony est une méthode d'immunoprécipitation (Nowotny, 1979) fondée sur la diffusion d'antigènes et d'anticorps en milieu solide (Bailey, 1996) à partir de puits placés en vis à vis.

➤ Principe

La méthode est basée sur la diffusion d'antigène et d'un immunosérum liquides chacun déposé dans un puit creusé dans un gel d'agarose, distancé entre eux. Ainsi les deux réactifs diffusent librement dans le gel et, lorsqu'ils se rencontrent en proportions convenables, forment une ligne ou bande de précipité appelé « arc de précipitation » (Willson et al., 1955).

➤ But

Identifié des immunoglobulines antitoxiques antidiphthériques présent dans le sérum antidiphthérique (European Pharmacopoeia, 2014).

➤ Mode opératoire

Selon le protocole décrit par la pharmacopée Européenne 9^{ème} édition « 2.7 Titrage biologique 2.7.1 Méthodes immunochimique » (European Pharmacopoeia, 2014).

• Préparation des réactifs

Solution de tampon phosphate buffered saline PBS à pH 7,25

- Mettre les constituants, Chlorure de sodium, phosphate disodique $12H_2O$, phosphate de potassium, et l'acide de sodium dans un ballon de 1 litre (Annexe 16).
- Introduire dans le ballon un barreau aimanté.
- Déposer le ballon sur une plaque chauffante et agiter jusqu'à dissolution.
- Mesurer du pH, s'il n'est pas égal à 7,25, ajuster avec une base (NaOH) ou un acide (HCl) jusqu'à avoir la valeur exigée.

Le gel d'agarose

- Introduire 1 g d'agarose pesé sur une balance dans un flacon de 250ml
- Ajouter 100 ml de tampon phosphate buffered saline PBS à 7,25.

- Introduire dans le flacon un barreau aimanté.
- Mettre le flacon dans un bécher rempli d'eau.
- Déposer le bécher sur une plaque chauffante.
- Régler l'agitateur et monter la température à 89°C (Bain marie).
- Attendre jusqu'à ce que la gélose devienne limpide, arrêter et retirer le flacon (Figure 24).
- Prendre des lames de verre ou boîtes de pétri, et couler la gélose sur ces dernières
- Laisser refroidir sur paille.

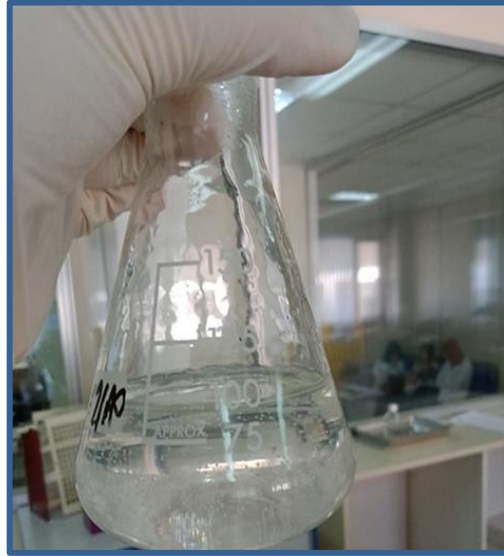


Figure 24 : Erlenmeyer contenant du gel d'agarose limpide sortie du bain marie
(Photographie originale).

Solution de décoloration

- Sous haute chimique, mélanger de l'acide acétique et du méthanol dans un ballon de 1 Litre (Annexe 17).
- Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distiller.

Colorant de bleu de Coomassie R 250

- Peser sur une balance une quantité de poudre de bleu de Coomassie R 250 et l'introduire par un entonnoir dans une fiole de 200 ml (Annexe 18).
 - Compléter jusqu'au trait de jauge avec la solution décolorantes précédente.
- **Préparation des puits**
 - A l'aide d'un emporte pièce creuser des puits de 4mm dans la gélose (environ 8 puits) en laissant 5-7 mm de distance entre chaque puit.

- Laisser les lames sur paillasse pendant 15 minutes.
- Conserver au frais à 4°C dans une boîte en plastique humide tapissé en papier adsorbant humidifié (Figure 25).



Figure 25 : Conservation de la lame dans une boîte en plastique et du flacon de vaccin au frais (Photographie originale).

- **Méthode de double diffusion**

Préparation de dilutions

- Pipeter 9 ml de solution PBS à pH 7,25 et déposer les dans 3 différents tube à essai aligner sur un portoir.
- Préparer une solution mère a partir de PBS à pH 7,25 et de sérum antidiphthérique (9 ml de PBS+1 ml de solutions à examiner (dilution de 10^{-1}).
-
- Prendre de la solution mère 1 ml et l'ajouter à un tube suivant (dilution de 10^{-2}), ainsi de suite refaire la même chose pour le 3 ème (dilution de 10^{-3}) (Figure 26).

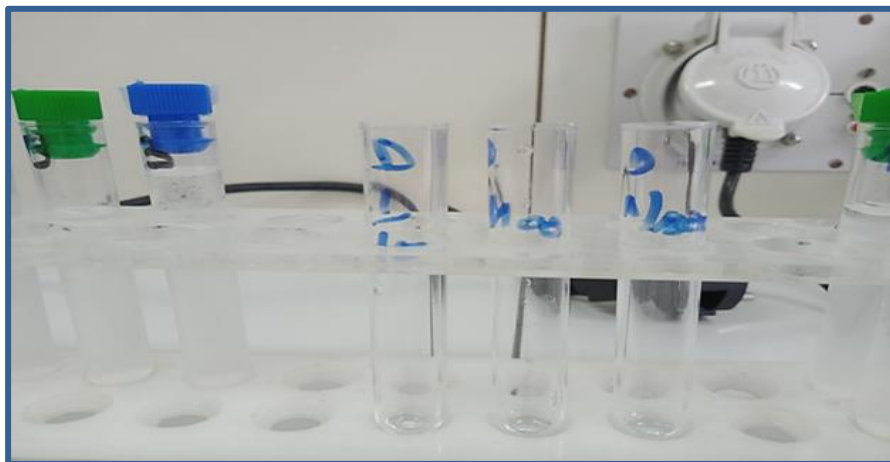


Figure 26 : Série de dilution de sérum antidiphthérique (Photographie originale).

Obtentions des antigènes diphtériques

On utilise un vaccin DTQ (diphtérie-tétanos coquelucheux), il contient les 3 antigènes (Feussom et al., 2008).

- Prendre 10 ml du vaccin à partir d'une seringue.
- Mettre le liquide dans un tube à hémolyse.
- Centrifuger le vaccin par une centrifugeuse à 3000 tours/min pendant 30 min.
- Ouvrir l'appareil, une fois fini deux phases apparaissent (le surnageant et le culot).
- Éliminer le surnageant à l'aide d'un pipeteur (cette partie contient des conservateurs, adjuvants, plus autres additifs).
- Ajouter 1,5 ml de citrate de sodium à 5 % (pour éviter la coagulation).
- Incuber pendant 24h à 37°C.
- Continuer avec de l'eau stérile jusqu'à avoir le tube rempli pour avoir 10 ml de volume initial.
- Centrifuger une autre fois à 3000 tours/min pendant 30 min.
- Récupérer le surnageant qui contient les antigènes diphtériques à l'aide d'une micropipette et le mettre dans un tube fermé.
- Conserver au frais à 4°C.

Distribution dans les puits

- Prendre une lame déjà préparée avec des puits.
- Déposer 10 µl de sérum à examiner dans la ligne supérieure de la lame.
- Déposer 10 µl des antigènes de référence dans la ligne inférieure de la lame.
- Laisser la lame sur paillasse pendant 10 min.
- Déposer ensuite la lame dans une boîte en plastique humide.
- Incuber 48-72 h à 25°C.

Lavage

- Retirer la lame de l'incubateur et la mettre dans un plateau en plastique contenant une solution de NaCl à 9 g/L.
- Laisser pendant 1 heure de lavage.
- Laver ensuite à l'eau distillée.

Séchage

- Sécher la lame laver avec du papier filtre dépassant la surface de la lame.
- Mettre une plaque en verre au dessus du papier, et un poids de 600g (afin de bien sécher la lame) (Figure 27).

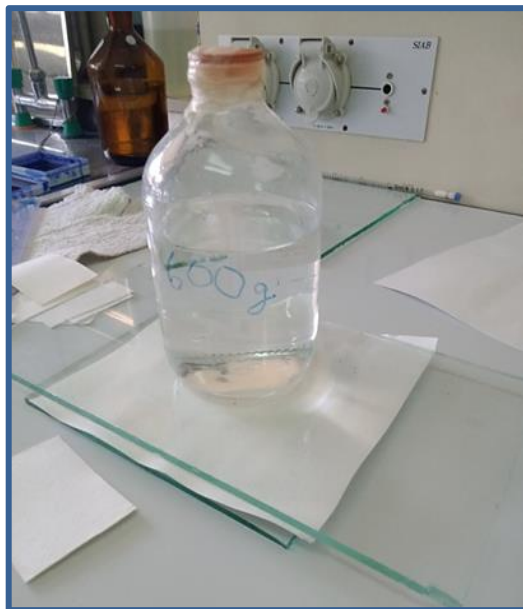


Figure 27 : Technique de séchage de la lame (Photographie originale).

Coloration :

- Déposer la lame dans un autre plateau en plastique à agitations ou agiter manuellement.
- Colorer avec la solution de bleu de coomassie R250 tout en agitant pendant 10min.
- Retirer la lame en le déposant dans un autre plateau en plastique à agitation.
- Décolorer par la suite avec la solution décolorante (jusqu'à ce que le bleu devienne plus clair) (Figure 28).



Figure 28 : Technique de coloration et décoloration de la lame (Photographie originale).

IV.3.4. Test d'innocuité

IV. 3.4.1. Contrôle de toxicité anormale sur souris

Le test de recherche de toxicité anormale est un test qui vérifie qu'aucune mortalité n'apparaissait sur cinq souris après injection d'un vaccin, d'un sérum ou d'autres substances, réalisé sur chaque lot fabriqué (Jebalia et al., 2014).

➤ Principe

Le principe de cette étude repose sur l'injection au niveau du péritoine le produit à examiner à des souris blanche pesant environ 17-22 g. Toutes les souris sont maintenues dans un environnement contrôlé (12 h de lumière et 12 h d'obscurité). La température de l'animalerie est maintenue constante (20-25°C). Les souris sont nourries avec des granules industrielles et de l'eau (Jebalia et al., 2014).

➤ Mode opératoire

Ce protocole décrit ci-dessus à était décrit selon la méthode décrite dans la pharmacopée européenne 8ème édition (European Pharmacopoeia, 2014).

• Préparation des souris de laboratoire pour le test

-Peser individuellement de l'ensemble des souris avant le test ; estomacs vide, poids entre 17g – 22g (jour 0 c'est le poids à l'inoculation) (Tableau 5).

Tableau 5 : Poids initial des souris expérimentale.

Souris	Souris 1	Souris 2	Souris3	Souris4	Souris 5	Souris témoin
Poids (g)	20,72	21,78	21,13	19,81	19,09	20,5

• Code de coloration des souris

- Marquer les souris du test avec un colorant :

Souris 1 = Tête rouge TR.

Souris 2 = Queue rouge QR.

Souris 3 = Tête bleu TB.

Souris 4 = Queue bleu QB.

Souris 5 = Tête rouge-Queue bleu TR-QB.

Souris témoin = non coloré (elle ne sera pas injecter).

- **Injection**

- Pipeter avec une seringue d'insuline 1ml de sérum antidiphthérique (1dose humain : est la dose de la préparation à examiner indiqué sur la notice de l'emballage dans dépasser 1ml pour l'animal).
- Injecter par voie intrapéritonéale à chaque souris.
- Noter la date d'injection, fournisseur, numéro de lot, initial de la personne sur une fiche coller sur la cage ou se trouvent les souris.
- Mettre les souris dans une cage convenable en s'assurant de mettre des aliments adéquats et de l'eau (la température adéquate est maintenue pendant toute la durée du test) (Figure 29).



Figure 29 : Incubation de souris injectées dans une cage dans une chambre d'incubation d'animalerie (Photographie originale).

- **Observation**

La durée du test est de 7 jours, l'observation de ces animaux se fait pendant cette période avec détection de mortalité éventuelle ou d'apparitions de symptôme de maladie.

- Observer les souris sur les trois premiers jours (j1 j2 j3).
- Remplir la fiche d'observation en utilisant des initial :

(O) : animal en bonne santé.

(M) : animal malade.

(+) : animal mort.

- Peser ces souris individuellement en notant leur poids sur la fiche.
- Répéter ces démarches pour les trois derniers jours (j4 j5 j6).

- **La peser final**

Ce point indique la fin du test, les souris sont peser et observer individuellement pour la dernière fois (perte/gain).

- **Lecture**

- Observation continue des souris pendant 7 jours.
- Noter le changement de poids observé ainsi que l'état des animaux expérimentaux.

Chapitre V :

Résultats et discussion

V. Résultats et discussion

V.1. Tests physico-chimiques

V.1.1. Dosage de protéines totales par biuret

Le dosage des protéines totales du sérum antidiphthérique a été réalisé par une méthode de colorimétrie par réactifs de biuret. La concentration en protéines a été mesurée par un spectrophotomètre de type (Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 Pro UV/VIS, 2014) à une onde de 545nm. Les concentrations sont exprimées en mg/ml.

Une coloration violette apparaît après l'ajout du réactif biuret (Figure 30), cela est dû à la formation du complexe des ions cuivriques avec les liaisons peptidiques contenues dans la solution à examiner. L'intensité de la coloration est mesurée par le spectrophotomètre à 545nm.



Figure 30 : Apparition de la couleur violette après ajout du réactif biuret.

Les résultats de dosage des protéines trouvés ([Annexe 19](#)), après un étalonnage préalable ont donné une valeur de $11,25 \pm 0,14$ mg/ml. Ce résultat est satisfaisant par rapport à l'exigence décrite par la Pharmacopée européenne 8ème édition ([European Pharmacopoeia, 2014](#)) : « ***La concentration doit être inférieur ou égale à 100 mg/ml (NI)*** »

Le dosage des protéines sériques est réaliser en employant l'absorption des rayonnements visible, la méthode biuret peut être automatisé facilement ([Skoog et West, 2015](#)). Mais cette dernière ne donne pas de résultats précis ([Bireche et al., 2014](#)).

La simplicité et la rapidité de la réaction de Biuret les rendent peu sensible, affirme [Bosset en 1974](#) et [Guillou en 1986](#). Par une étude sur le dosage des protéines du lait, ils ont constaté que cette dernière se prête mal au dosage de solution contenant des lipides (matière grasse et les caséines) ; à cause de la turbidité que ces molécules peuvent provoquer dans le milieu. Et du lactose qui interfère par son caractère réducteur (risque de réduire les ions de cuivre) ([Bosset et al., 1974](#)), ce qui fausse les résultats ([Guillou et al., 1986](#)).

Les méthodes spectrophotométriques dans l'UV sont des méthodes très intéressantes car elles sont rapides, simples et performantes. Elles demandent moins de manipulation que les méthodes chimiques, mais exigent un matériel coûteux et très spécialisé. L'avantage de la quantification des protéines par les méthodes physiques ; est que l'échantillon peut être récupéré et il est relativement quantitatif si un coefficient précis d'extinction est connu ([Leach et Scheraga, 1980](#)).

Mais, la mesure de l'intensité des protéines par la méthode spectrométrique ne présente pas que des avantages, elle est limitée à son tour. Diverses protéines contenues dans un échantillon ont des teneurs différentes en acides aminés et l'absorption de l'UV est donc différente d'une protéines à une autre ([Guillou et al., 1986](#)). La turbidité de solution affecte également le passage de l'UV, ce qui fausse les résultats ([Pollender, 1983](#)).

V.1.2. Mesure du pH

La mesure du pH a été effectuée à l'aide d'un pH-mètre de type (SeichemTech.SCT-BEN-1pH Meter, Belgique). Après 3 essais de mesure de la solution à examiner l'appareil affiche un pH de $6,5 \pm 0,01$.

La valeur moyenne de pH du sérum antidiphthérique est acceptable au vue de la norme énoncée par la Pharmacopée Européenne. La norme fixée par World Health Organisation dicte que le pH des immunosérums d'origine animale à usage humain doit être entre une fourchette de 6,0 à 6,7 ([WHO, 1977](#)).

Toutes les cellules, tous les organes, tous les fluides du corps ont besoin d'un niveau de pH particulier pour fournir une performance optimale. Ils sont donc très sensibles au degré d'acidité et ne fonctionnent bien qu'en présence d'un pH très spécifique. L'introduction d'un pH non adapté peut donc engendré des modifications structurelles de ces dernières. Le pH plasmatique varie normalement de 7,38 à 7,42. Notre corps, programmé pour vivre dans un

parfait équilibre, ne tolère que de très petits écarts en amont ou en aval de cet équilibre, et tout écart important peut provoquer de graves troubles de la santé (Christian, 2016).

V.1.3. Volume extractible

Le volume extractible des trois flacons du sérum injectable est conforme à l'essai, l'éprouvette affiche exactement 30 ml qui correspond à $10,00 \pm 0,4$ ml par flacon.

Le volume moyen a été déterminé selon la formule suivante :

$$V_m = \frac{VC}{n}$$

Avec : V_m : volume moyen (en ml) ; VC : volume contenu dans le cylindre gradué (en ml) ; et le n : nombre d'ampoules utilisées.

Le volume de l'injection dans un récipient uni dose est généralement suffisant pour permettre le retrait de la dose nominale. Le flacon uni dose ne contient pas de quantité relative au volume déclaré qui présenterait un risque si le contenu entier était administré. Son principe consiste à vider le flacon aussi complètement que possible et déterminer selon le cas la masse ou le volume de son contenu (Mpondo, 2017).

Le respect de l'exigence du volume extractible est assuré en rendant le volume de remplissage supérieur au volume nominal à un degré déterminé par les caractéristiques du produit. Les suspensions doivent être bien agitées avant le retrait du contenu et avant de procéder à la détermination de la densité (Le Hir (b), 2001).

L'essai d'uniformité de des comprimés permet de s'assurer qu'au cours de la fabrication, la répartition du mélange en unités de prises, a été suffisamment précise et uniforme pour garantir une même masse ou volume pour l'ensemble des comprimés d'un même lot. D'ailleurs, la pharmacopée Européenne exige le nombre de flacon à utiliser suivant le volume de l'immun-liquide comme suit (European Pharmacopoeia, 2014).

- supérieur de 3 ml et inférieur à 10 ml : 3 flacons.
- inférieur de 3 ml : 5 flacons.
- égale ou supérieur à 10ml : 1 seul flacon.

V.1.4. dosage du crésol

Le dosage du pourcentage de crésol contenu dans le sérum antidiphthérique à été réalisé par une méthode de colorimétrie. La concentration a été mesurée par un spectrophotomètre de type (Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 Pro UV/VIS, 2014) à une onde de 506 nm. Les concentrations sont exprimées en g/L.

Une coloration rouge brun apparaît après l'ajout du réactif 4-aminoantipyrine en présence du ferricyanure de potassium, cela est dû au contact de ces réactifs avec le dérivé du phénol (Emerson, 1943) (Figure 31). L'intensité de la coloration est mesurée par le spectrophotomètre à 545 m.

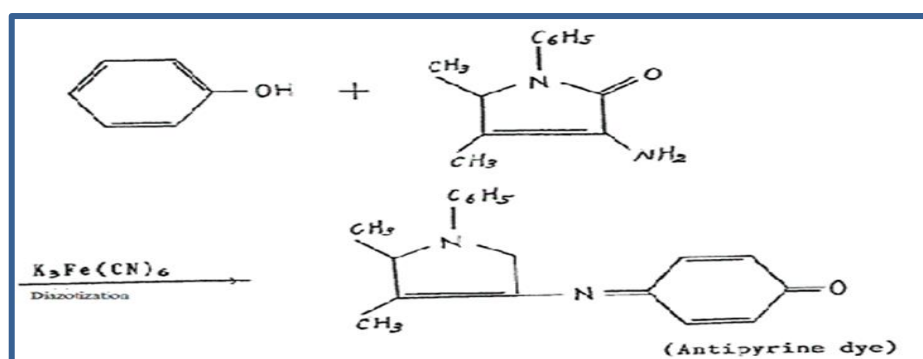


Figure 31 : Réaction du phénol avec le 4-aminoantipyrine en présence du ferricyanure de potassium (Lien 10).

Les résultats de dosage du conservateur trouvés (Annexe 20), après un étalonnage préalable ont donné une valeur de $1,51 \pm 0,02$ g/L soit 0,15%. Ce résultat est satisfaisant par rapport à l'exigence décrite par la Pharmacopée Européenne 8ème édition (European Pharmacopoeia, 2014) « *Immunosérums d'origine animale à usage humain doit contenir une concentration $\leq 3,3$ g/l* ».

Les travaux de Fatihi et Mols en 2018, ont rapporté que le crésol est un " poison protoplasmique " dont les mécanismes sont encore mal compris. En effet une dose de 16 cm^3 de crésol cause des intoxications mortelles. Peu importe la voie d'entrée, cette toxicité diffuse rapidement et affecte plusieurs métabolismes, particulièrement hépatique, rénale, hématologique, cardiovasculaire et neurologique (Fatihi et Mols, 2018).

D'autres article officielle de l'organisation mondiale de la santé, rapportent également qu'à une certaine concentration, les conservateurs pourraient modifier l'efficacité et l'innocuité du sérum thérapeutique. Même si plusieurs études ont été réalisées pour comparer l'efficacité

des différents préservateurs, leurs résultats sont limités et peu concluants et des recherche sur ce type de produits est nécessaire ([Lien 11](#)).

V.2. Test d'identité

V.2.1. Méthode de double diffusion « Ouchterlony »

Le test d'identité a été réalisé par la méthode immunologique connu sous le nom de méthode de « double diffusion » ou « méthode d'Ouchterlony ». Son principe se base à faire diffuser l'antigène et l'anticorps simultanément l'un vers l'autre, à partir de puits creusés sur une couche de gélose. Un arc de précipitation de couleur blanchâtre plus en moins incurvé apparaît après 72h d'incubation (Figure 32).

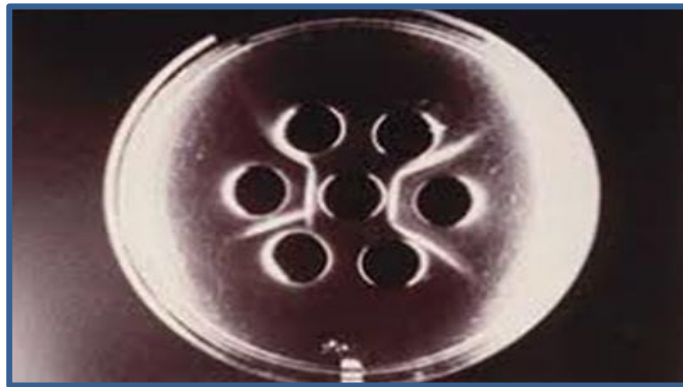


Figure 32 : Apparition d'arcs de précipitations par méthode de double diffusion réalisée sur boîte de pétri ([Benex, 1971](#)).

Dans les tests d'immunodiffusions, on permet à l'anticorps et à l'antigène de se diffuser l'un allant vers l'autre sur un support. Dans la zone dite de proportions optimales un précipité se forme et agit comme une barrière pour empêcher ces deux derniers de partir au-delà de la ligne de précipitation. Par leur sensibilité, ces tests ont servi de base pour démontrer l'antigène de l'hépatite à sérum (HS ou antigène australien) ([Jawzet et al., 1973](#)).

L'immunosérum contient des anticorps qui réagissent spécifiquement avec l'antigène qui provoque la précipitation, ce qui signifie qu'il y'a eu une formation d'un complexe « Ag-Ac ». Cette réaction très spécifique et très sensible utilisée en milieu gélifié était la méthode dont [Bulboz](#) en 1962, a fait usage afin de dépister la falsification de préparations de viande. Ces études affirment la réussite de cette méthode pour détecter l'identité ou en autre terme l'anticorps spécifique de la maladie ([Bulboz et al., 1962](#)). Cette méthode est purement qualitative, elle ne peut en aucun cas donner le taux d'anticorps trouvé dans les sérum d'après l'étude de [Wallraf](#)


en 1968, ce qui peut s’avérer un inconvénient (Wallraf et al., 1968). Mais cela ne l’empêche pas d’être utilisée pour des tests d’identité des produits immunologique.

V.3. Test de stérilité

V.3.1. Incubation sur milieu thioglycolate

Le test de stérilité est un test *in vitro*. Le test de stérilité de l’immunosérum a été fait dans l’unité de microbiologie par culture sur le « milieu liquide thioglycolate » exigé par l’World Health Organisation (WHO, 1977) (Tableau 6).

Tableau 6 : Résultats du test de stérilité des tubes ensemencé par sérum antidiphthérique.

	Milieu culture	de	Type du milieu	Ensemencement Par immunosérum (ml)	Condition d’incubation °C/ 7jours	observation
Tube 1	Thioglycolate		Liquide	1 ml	37	
Tube 2	Thioglycolate		Liquide	1 ml	37	
Tube 3	Thioglycolate		Liquide	1 ml	37	
Tube 4	Thioglycolate		Liquide	1 ml	37	
Tube 5	Thioglycolate		Liquide	1 ml	37	
Tube de référence	Thioglycolate		Liquide	0 ml	37	

Le tableau montrent une absence totale de toute prolifération microbienne dans les tubes, ce qui confirme leurs stérilité totale et la parfaite conformité de l’immunosérum microbiologiquement.

Le test de stérilité des produits biologiques est fait par culture sur des milieux aéro-anaérobiques. Ce test est conçu afin de détecter des agents étrangers contenus dans ces produits (Baharfaset et al., 1976). Le milieu thioglycolate (Annexe 2) est un milieu qui a été introduit par Brewer en 1940 dans l’intérêt de cultiver des bactéries anaérobique (Brewer, 1940).

Les études de Nungester en 1943, rapportent que ce milieu présente un avantage des provisions nécessaires en terme de croissance d’une large variété de bactéries aérobiques et les anaérobiques, et d’une propriété de neutralisation de l’action bactéricide, et les composés mercuriels (Nungester et al., 1943). D’après les travaux de Houari en 2017, si une croissance est observée cela peut être du a une contamination extérieure. Il est donc obligé de refaire le test avec le même échantillon. Aussi, si le test de stérilité est positif, ce dernier est suivi par un test d’identification (Houari, 2017).

V.4. Test d’innocuité

V.4.1. Test de toxicité anormale

Le test d’innocuité est mené pour évaluer la possibilité que des substances aient des effets nocifs pour la santé d’organismes vivants. Le poids a été pesé par une balance de type (Sartorius BP 3100 S, 2015) d’une précision de 0,01 g. Après observation de souris blanche pendant 7 jours, il ressort ce qui suit (Tableau 7 et 8) :

Tableau 7 : Observation de l’état des souris expérimentale durant la durée du test.

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
Souris TR	O	O	O	O	O	O	O
Souris QR	O	O	O	O	O	O	O
Souris TB	O	O	O	O	O	O	O
Souris QB	O	O	O	O	O	O	O
Souris TG-QB	O	O	O	O	O	O	O

(O) : Bonne santé.

Tableau 8 : Observation du changement de poids des souris expérimentales durant la durée de test.

	Trois premiers jours	Trois derniers jours	Pesée finale
TR (g)	22,22	23,72	24,19
QR(g)	23,08	24,58	25,02
TB(g)	22,53	24,03	24,33
QB(g)	21,41	22,91	23,31
TR-QB(g)	20,59	21,89	22,39
Témoin(g)	22,01	23,51	23,97

Les deux tableaux ci-dessus montrent que les souris sont en bonne santé et survivent à l'issue de la période d'observation avec un gain progressif de leurs poids. Ce qui mène à dire que le sérum antidiphthérique est conforme et totalement stérile.

D'après [Thraenhart](#) en 1989, l'innocuité de tout produits immunologique à usage humain est vérifiée par l'injection de cobayes ou aux animaux cibles. Si 70 % des animaux inoculés survivent, le test est jugé suffisant et satisfaisant (absence de toute toxicité anormale). En cas inverse le test a échoué ([Thraenhart, 1989](#)).

D'après [Blanco](#) en 1989, un produit est dit totalement stérile, celui qui n'a présenté aucun signe clinique, ni réaction locale et ni de lésion macroscopique observée chez les animaux autopsiés ([Blanco et al., 1989](#)).

Néanmoins, la communauté scientifique cherche activement à réduire le recours à l'expérimentation animale suite à la directive européenne [2010/63/EU](#).

Discussion générale

Le contrôle analytique effectué sur les immunosérums par les laboratoires de contrôle qualité agréés par l'autorité nationale de contrôle, se base sur les critères et les exigences de l'OMS, la commission de la pharmacopée Européenne et ainsi aux normes ISO (international organisation for standardisation).

L'autorité Nationale de contrôle suit le protocole approuvé dans le dossier d'autorisation de mise sur me marché AMM, dont la description des techniques analytiques, biologique et microbiologique s'effectuera pour chaque lot transmis par l'importateur ou le fabricant.

La totalité des tests se basent sur des méthodes et techniques décrite par la pharmacopée. Pourtant il y'a eu beaucoup de changements sur certain test effectué sur les immunosérums à usage humain, tel la suppression de l'essai de toxicité anormale par la pharmacopée en janvier 2019. Cette lois est venu pour rendre possible l'application du principe des 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*) en référence à la substitution, la réduction et l'amélioration de l'utilisation des animaux à des fins expérimentaux ([Fenwick et al., 2009](#)).

L'objectif de notre étude était de déterminer la qualité des produits immunologique à usage humain notamment l'immunosérum antidiphthérique.

En effet certains tests donnent un bon rendement en critères de jugements sur la qualité tel le test d'innocuité, de stérilité et même sur le dosage de certains constituant (protéines, préservateur). Les résultats trouvés en pratique correspondent aux normes exigées.

Mais cela reste insuffisants pour déterminé la qualité totale, la nécessité de poursuivre les restant des tests se fait ressentir. Le sérum antidiphthérique est constitué de plusieurs composés dont leur identité doit être vérifiée, tel que la concentration des solutés dissoute dans les sérums et le test d'apparence.

Outre, « Les méthodes rapides existent depuis une trentaine d'années, mais peinent toujours à s'imposer en test de routine » annonce ERIC Petat dirigeant d'[ACM Pharma \(Lien 12\)](#). Les méthodes de la biologique traditionnelle prennent un temps pour que les résultats apparaissent ; mais avec des méthodes plus rapide, le contrôle des immunosérum peut s'effectuée en un temps plus réduit.

Cependant, il est possible de faire appel à différents méthodes rapides pour effectuer les différents essais et tests exigées pour de contrôle de qualité, dont les résultats peuvent être donnés en temps réel.

Par l'introduction de la technique de « Titrage de Ramon » déjà expliqué dans la partie bibliographique et d'une technique de « Dodécylsulfate de sodium-électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) ».

Le « SDS-PAGE » est une méthode très utilisée pour contrôler la pureté, l'homogénéité des lots et la stabilité d'une protéine thérapeutique et également pour surveiller la cohérence de la fabrication depuis la taille des protéines et donc la pureté des protéines ([Rodat, 2009](#)).

Son principe se base sur la présence du sodium dodecyl sulfate (SDS) et d'un agent réducteur (2-mercaptoéthanol), qui engendrent la dénaturation de la structure quaternaire et la structure tridimensionnelle native des protéines, les protéines n'ont plus de ponts disulfures et ainsi la charge intrinsèque de la protéine est masquée. Il en résulte un complexe SDS protéine avec une charge constante. Donc la mobilité électrophorétique du complexe est proportionnelle au poids moléculaire de la protéine. En fin la visualisation des protéines peut se faire par différentes méthodes de détection par exemple ; coloration par bleu de Coomassie ou des argent plus sensibles. Le poids d'une protéine donnée peut donc être estimé à partir d'une série d'étalons de protéines ([Salas et al., 2006](#)).

La première technique permettra de faire un test d'identité plus rapide (à la place de la technique Ouchterlony), tandis que la seconde, un test pureté. Le titrage donnera la quantité des anticorps trouvés dans la solution et l'électrophorèse déterminera l'identité soit la pureté, présence d'anticorps monoclonaux dans le sérum thérapeutique (selon leurs migrations sur le gel et selon leur poids moléculaire). Ce qui réduira le temps du contrôle des immunosérums pour être libéré du laboratoire d'une part et d'une autre part ces techniques sont moins coûteuses et facile à effectuer. Et pas que, les résultats de ces tests pouvant déterminer l'innocuité de ces produits injectables et donc évincer le test de la toxicité anormale.

Les tests de stérilité prennent également du temps, ce qui cause un inconvénient pour libérer plus rapidement les sérums thérapeutiques. Sur ce fait, il existe effectivement plusieurs méthodes microbiologiques.

Parmi elles, l'impédancemétrie, qui est une technique analytique qui permet une détection des microorganismes avec sensibilité (Felice et al., 1999). Elle est considérée comme une méthode alternative rapide dans le domaine de l'industrie agroalimentaire ou pharmaco-cosmétique, et vise à détecter et quantifier les bactéries d'un produit, dans le cadre par exemple d'un test de stérilité secteurs (Rule, 1997).

Son principe consiste à utiliser une gamme de plusieurs milieux de cultures permettant de cibler les différents types de microorganismes recherchés au laboratoire. Les protéines et les sucres trouvés dans le milieu de culture sont électriquement neutres et faiblement ionisés. Les micro-organismes transforment ces molécules et libèrent des molécules plus petites, tels que des acides aminés ou du lactate par exemple, qui possèdent une charge et une mobilité électrique nettement supérieures aux molécules d'origine. Ces modifications peuvent être mesurées grâce à un couple d'électrodes immergées dans le milieu de croissance. La sensibilité des appareils permet de mesurer en temps réel la croissance bactérienne par une mesure électrique des variations très faibles d'impédance (la résistance du milieu à un courant électrique entre deux électrodes), et donc de détecter des quantités très faibles de bactéries longtemps avant que des colonies ne soit visibles sur boîtes de Pétri. Le principal intérêt de ces techniques est de produire des résultats significativement plus rapidement (habituellement en 2 à 24 heures) (Rouillard, 2004).

Il serait donc intéressant, pour compléter ce travail, de réaliser des études plus approfondies sur ces méthodes pour contribuer à l'amélioration du contrôle de la qualité et de la sécurité.

Conclusion

Certes la diphtérie a été éradiquée dans plusieurs pays dans le monde, mais reste présente dans d'autres, notamment ceux en voie de développement ou ceux du tiers monde où les conditions sanitaires sont médiocres. Cette maladie reste une urgence médicale, l'acquisition des traitements curatifs « sérum thérapeutique » et préventifs « vaccins » est donc obligatoire.

Bien que la qualité, l'innocuité et l'efficacité d'un médicament relève de la responsabilité du fabricant, c'est surtout l'autorité nationale de contrôle, qui établit indépendamment les procédures destinées à garantir la conformité des produits aux normes exigées.

Le contrôle, sorte de filtre destiné à piéger les produits non conformes qui ne satisfont pas une exigence spécifiée, est donc une obligation, qui s'effectuera par des inspections biochimiques et microbiologiques régulières.

Ce qu'il faut retenir à partir de notre étude réalisée dans le laboratoire de contrôle de qualité des vaccins et des sérums à usage humain à l'Institut Pasteur d'Alger (IPA) sur l'antisérum diphtérique « Antitoxine diphtérique B.P » importé de l'Inde. Ce dernier est en conformité avec les exigences nationales soit : une concentration en protéine totale de $11,26 \pm 0,14$ mg/ml, un pH de $6,5 \pm 0,01$, un volume extractible de 10 ml présent dans le flacon, une concentration de conservateur Crésol de 0,15%, un test d'identité positive, et ainsi qu'une absence totale de germes. En fin un test de toxicité négative prouvant l'innocuité du produit.

Ces données sont certes en adéquation avec les normes et les méthodes recommandées par les normes de la pharmacopée en vigueur. Mais un complément de recherche est recommandé pour déterminer la conformité totale du produit car malheureusement l'expérimentation y afférente n'a pu être menée à terme, affectée négativement par la pandémie mondiale Covid-19 avec des dispositifs sanitaires d'un confinement strict décidé par le pouvoir public qui a interrompu nos travaux au niveau du laboratoire de contrôle qualité à l'Institut Pasteur.

Cependant ce travail ouvre différentes perspectives dans le domaine du contrôle des médicaments à fins thérapeutiques.

D'une part, au regard de la fiabilité des méthodes, il apparaît naturel de poursuivre le cycle de vie des méthodes, par l'évaluation périodique, la maintenance et la maîtrise des changements.

D'autre part, il est possible alors d'envisager une toute autre approche, par l'introduction de nouvelles techniques plus rapides pour effectivement libérer les lots, en l'occurrence celles discutées dans la partie discussion.

En conclusion, les progrès de la biotechnologie ont été extrêmement remarquables ces dernières années dans les fabrications des médicaments à partir des organismes vivants. Mais le contrôle de qualité en biotechnologie ne s'arrête pas à la fabrication, un suivi de cette dernière est obligatoire.

*Références
bibliographiques*

- Aaron, L., Heurtebise, F., Bachelier, M. N., et Guimard, Y. (2006).** Pseudomembranous diphtheria caused by *Corynebacterium ulcerans*. *La Revue de médecine interne*, 27(4), 333-335.
- Abdoulaye, M. (2018).** Les Vaccins : Utilisation des Excipients dans leur procédé de fabrication. Thèse pour l'obtention d'un diplôme d'état de docteur en pharmacie. Faculté De Pharmacie Institut Des Sciences Pharmaceutiques Et Biologiques. Université Claude Bernard - Lyon 1. 25 p.
- Abbas, A., Lichtman, A., Masson, P., Pillai, S. et Scott, J. (2020).** Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. Elsevier Health Sciences. 19 p.
- Alberto, C., Osdoit, S., Bellec, L., Belmonte, O., Yvin, J. L., et Bagny, K. (2016).** La diphtérie existe encore!. In *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. Elsevier Masson. (143), No. 12, S153.
- Alberto, C. (2017).** Des ulcères cutanés révélant une diphtérie : une maladie re-émergente. Thèse d'obtention de diplôme d'état de Docteur en médecine. Faculté de Médecine. Université Toulouse III-Paul Sabatier. 16 p.
- Ali-Rachedi, F., Meraghni, S., Touaibia, N., et Mesbah, S. (2018).** Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne. *Scabiosa Atropurpurea sub. Maritima L.* Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège ,87.
- Alioua, A. (2012).** La Revue Annuelle Qualité du Produit "Une démarche managériale vers une extension normative ISO 9001. Thèse de doctorat pour l'obtention d'un doctorat en Pharmacie. Faculté de Médecine et de Pharmacie –Rabat. Université Mohammed V. 4p.
- Alexandre, C. (2018).** Santé et Sexualité chez les Témoins de Jéhovah. 61 p.
- Amies, C. (1941).** The Stability of Tetanus Antitoxin under Sub optimal Storage Conditions. *British medical journal*, 1(4192), 709.
- Amiot, M., Aubert, S., Gonnet, M. et Tacchini, M. (1989).** Les composés phénoliques des miels : étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. *Apidologie*, 20(2), 115-125.
- Agust, F. (2016).** Freidrich Loeffler and Diphtheria. *Journal of the Association of Physicians of India*, 64 2, 97.

- Andriollo, O., Machuron, L., Videau, J., Abelli, C., Piot, S. et Muller, D. (1997).** Approvisionnements pour l'aide humanitaire ou les pays en développement : la qualité du médicament essentiel multisource. *STP Pharma Prat*, 7(6), 412-429.
- Baharsefat, M., Aarabi, I., Ardelali, M., Darakhchan, H., Hedayati, M. et Mirkarimi, A. (1976).** Immunisation active des bovins par le vaccin associé antisepticémie hémorragique (pasteurellose) et anticharbon symptomatique (Quartiers noirs) en Iran. *Archives of Razi Institute*, 28(1), 51-56.
- Bailey, G. S. (1996).** Ouchterlony double immunodiffusion. In *The protein protocols handbook*. Humana Press, 749-752.
- Barbara, D., et Clark, M. (1982).** A simple indirect ELISA using F (ab')₂ fragments of immunoglobulin. *Journal of General Virology*, 58(2), 315-322.
- Barksdale, L. (1970).** *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. *Bacteriological reviews*, 34(4), 378.
- Balin, S., et Giard, V. (2007).** La qualité des services et leurs processus de production. In *Actes du 7e Congrès international de génie industriel*. Trois-Rivières, Québec (Canada). 1-12.
- Baron, S., Bimet, F., Lequellec-Nathan, M., Patey, O., Ribiere, I., et Vachon, F. (1998).** Conduite à tenir lors de l'apparition d'un cas de diphtérie. *Bull. Epidemiol. Hebd*, 23, 1-9.
- Baxerres, C. (2014).** Du médicament informel au médicament libéralisé. Paris, Éditions des Archives contemporaines. 122 p.
- Bayne-Jones, S. (1924).** The titration of diphtheria toxin and antitoxin by Ramon's flocculation method. *The Journal of Immunology*, 9(6), 481-504.
- Bejan-Angoulvant, T. et Alexandre, J. (2019).** Mécanismes d'action et toxicités potentielles des anticorps monoclonaux. *médecine/sciences*, 35(12), 1114-1120.
- Belhocine, S. et Rahal, K. (1997).** L'épidémiologie de diphtérie en Algérie (1993–1995). *Données bactériologiques, Médecine et Maladies Infectieuses*, 27(10), 842-847.

- Benamrouche, B. (2016).** Caractérisation phénotypique et génotypique de *Corynebacterium diphtheriae*. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Médecine. Faculté de Médecine d'Alger. Université d'Alger I Benyoucef Benkhedda. 02 p.
- Benex, J. (1971).** Extraits antigéniques spécifiques obtenus à partir d'*Entamoeba histolytica* maintenues en culture mixte-I. Obtention-Charactérisation chimique et immunologique d'un extrait total. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 46(5), 533-544.
- Bernard, K. (2012).** The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *Journal of clinical microbiology* 50(10), 3152-3158.
- Besançon, P. (1995).** Innocuité et disponibilité des nutriments dans les aliments de complément. L'alimentation de complément du jeune enfant. Orstom, Paris. 105-122.
- Bireche, M., Bakchiche, B., Maatallah, M., et Gherib, A. (2014).** Propriétés physico-chimiques de lipide et quantification des protéines de graines des fruits *Citrullus Colocynthis* [Physicochemical properties of lipid and quantification of proteins of *Citrullus Colocynthis* seed oil]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 9(4), 1946.
- Blancou, J., Artois, M., Brochier, B., Thomas, I., Pastoret, P. P., Desmetre, P., et Kieny, M. P. (1989).** Innocuité et efficacité d'un vaccin antirabique recombinant des virus de la vaccine et de la rage administré par voie orale au renard, au chien et au chat. In *Annales de Recherches Vétérinaires*. 20, No. 2, 195-204.
- Bosset, J., Blanc, B., et Plattner, E. (1974).** Nouvelle méthode de dosage photométrique automatique des protéines dans le lait entier : Partie I. Bases théoriques et optimisation des principaux paramètres de la réaction. *Analytica Chimica Acta*, 70(2), 327-339.
- Both, L., White, J., Mandal, S., et Efstratiou, A. (2014).** Access to diphtheria antitoxin for therapy and diagnostics. *Eurosurveillance* 19(24), 20830.
- Brémaud, C., Claisse, J. R., Leulier, F., Thibault, J. et Ulrich, E. (2006).** Alimentation, santé, qualité de l'environnement et du cadre de vie en milieu rural. DIJON Cedex, France: Educagri éditions. 222 p.

- Brossard, D., Charrueau, C., Chaumeil, J., Crauste-Manciet, S. et Le Hir, A. (2016).** Pharmacie Galénique: Bonnes Pratiques de Fabrication des Médicaments. Elsevier Masson. 11 p.
- Brewer, J. (1940).** Clear liquid mediums for the aerobic cultivation of anaerobes. *Journal of the American Medical Association*, 115(8), 598-600.
- Bubloz, A. (1962).** Contribution au Dépistage de Falsifications de Préparations de Viande par Adjonction de Viande de Cheval. Application de la Méthode de Double Diffusion dans le Gel (Ouchterlony). *Zentralblattfür Veterinärmedizin*, 9(10), 961-977.
- Camara, M. (2006).** Etude épidémiologique des voies d'administration médicamenteuse dans le service de pédiatrie de l'hôpital Gabriel Toure. Faculté de Médecine de pharmacie et d'odonto-stomatologie, Université De Bamako. 35 p.
- Cameron, R., Miloradovic, L., Cheyne, I., et Healy, K. (2000).** The Removal of Viruses During the Purification of Equine Antisera using Filtration AidsHyflo Super-Cel™ and Fulmont™ Super A ; *Biologicals*, 28(3), 169-174.
- Cariou, T. (2015).** Mesure du pH en milieu littoral. 02 p.
- Chapel, H., Haeney, M., et Misbah, S. (2004).** Immunologie clinique : De la théorie à la pratique, avec cas cliniques. De Boeck Supérieur. 17 p.
- Chassaing, A. (2008).** Mécanisme de translocation de la toxine diphtérique. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Biochimie Biophysique. Du Muséum National d'Histoire Naturelle. 128 p.
- Chovelon, B. (2015).** Développement d'une méthode de dosage à base d'aptamères impliquant la formation d'un complexe boucle-boucle. Thèse pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. Faculté de Pharmacie. Université Joseph Fourier Grenoble. 13 p.
- Christian, B. R. U. N. (2016).** Tout est une question d'équilibre acido-basique. Solar. 115 p.
- Clevy, C., Marinone, C., Bagnères, D., Brajon, D., Rossi, P., et Berbis, P. (2014).** Diphtérie cutanée : une cause exceptionnelle d'ulcération cutanée. In *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. Elsevier Masson. 141, No. 12, S451.

- Coen, M., Alberto, C., Eperon, G. A., Cherkaoui, A., et Schrenzel, J. (2019).** Diphtérie : nouvelle présentation clinique d'une ancienne maladie. *Revue médicale suisse*, 15(646), 786-790.
- Collier, R. J. (2001).** Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon*, 39(11), 1793-1803.
- Collier, R. J. (1975).** Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriological reviews*, 39(1), 54.
- Collins, A., Palmer, E., Bézard, J., Burke, J., Duchamp, G., et Buckley, T. (1997).** A comparison of the biochemical composition of equine follicular fluid and serum at four different stages of the follicular cycle. *Equine Veterinary Journal*, 29(S25), 12-16.
- Colombo, A. V., Hirata, R., De Souza, C., Monteiro-Leal, L., Previato, J., Formiga, L., et Mattos-Guaraldi, A. (2001).** *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes. *FEMS microbiology letters*, 197(2), 235-239.
- Cooper, G. (1999).** La cellule : une approche moléculaire. De Boeck Supérieur. 383 p.
- Daoudi-Dabladji, R. (2016).** Classification du cancer du sein par des approches basées sur les systèmes immunitaires artificiels. Thèse pour l'obtention d'un diplôme d'état de Docteur en informatique. Ecole doctorale des sciences et technologie de l'informatique et du développement. Université de Paris-Saclay. Préparée à l'Université d'Evry Val D'Essone. 09 p.
- De l'Europe-DEQM-Direction, C., du Médicament, E. D. L. Q., et de Santé, S. (2014).** Pharmacopée Européenne. 08 p.
- Demont, M. (2015).** De la sérothérapie à l'immunothérapie moderne : un siècle d'avancées médicales. Thèse pour obtention d'un diplôme d'état de Docteur en Pharmacie. Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille. Université de Lille 2. 14 p.
- Demont, M., et Carnoy, C. (2016).** Il y a un siècle, l'âge d'or de la sérothérapie. 59 p.
- Delves, P., Burton, D., Martin, S., et Roitt, I. (2008).** Les fondements de l'immunologie. De Boeck Supérieur. 42 p.
- Descy, J. et Piret, S. (2017).** A propos de diphtérie. 7-11 p.

- De Taeye, S., Rispens, T. et Vidarsson, G. (2019).** The ligands for human IgG and their effect or functions. *Antibodies*, 8(2), 30.
- Djelouat, O., et Lahlou, C. (2018).** Le marché du médicament en Algérie. 6ème Conférence Internationale en Economie-Gestion & Commer.
- Dos Santos, C., Dos Santos, L., De Souza, M., dos Santos Dourado, F., De Souza de Oliveira Dias, A., Sabbadini, P., et De Mattos-Guaraldi, A. (2010).** Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxicogenic and toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. *Microbiology and immunology*, 54(1), 1-10.
- Dumas, M., Zumelzu, C., Pomares, T., Rouyer, C., Laroche, L., et Caux, F. (2017).** Diphtérie cutanée au retour du Sénégal. In *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. Elsevier Masson. 144 (12), S280-S281.
- Dupin, H. (1992).** Alimentation et nutrition humaines. ESF éditeur. 1336 p.
- Edholm, E. S., Bengten, E., et Wilson, M. (2011).** Insights into the function of IgD. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1309-1316.
- European Pharmacopoeia - 8th Edition (2014) – Chapter** (2.4.18), (2.5.13) (2.6.1), (2.6.8), (2.6.14), (2,6,16) (2.6.21), (2.7.6), (2.7.7), (2.7.1), (2.7.8), (2.2.3) (2.7).
- Emerson, E. (1943).** The condensation of aminoantipyrine. II. A new color test for phenolic compounds. *The Journal of Organic Chemistry*, 8(5), 417-428.
- Européenne, P. (2019).** Guide pour l'élaboration et l'utilisation des monographies de vaccins et d'immunosérums pour usage humain .Pharmacopée européenne. 16-21 p.
- Fabre, I. (2008).** Méthodes substitutives à l'expérimentation animale, aspects réglementaires, état de l'art et perspectives, *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. Communication. 404-406 p.
- Fatihi, S., et Mols, P. (2018).** A propos d'une intoxication aux crésols. *Revue médicale de Bruxelles*, 39(3), 150-154.
- Fenwick, N., Griffin, G. et Gauthier, C. (2009).** The welfare of animals used in science: How the “Three Rs” ethic guides improvements. *The Canadian Veterinary Journal*, 50(5), 523.

- Felice, C. J., Madrid, R. E., Olivera, J. M., Rotger, V. I., et Valentinuzzi, M. E. (1999).** Impedance microbiology: quantification of bacterial content in milk by means of capacitance growth curves. *Journal of microbiological methods*, 35(1), 37-42.
- Feussom, J., et Akakpo, J. (2008).** Sociétés correspondantes ; *Bull Soc Pathol Exot*, 101(5), 448-451.
- Fierer, J., Looney, D., Kok, M., et Pechère, J. (2010).** Nature and pathogenicity of micro-organisms. *Infectious Diseases*. 03 p.
- Forbes, M. (2010).** Optical spectroscopy of mass-selected ions in the gas phase. Thèse pour l'obtention d'un diplôme de docteur en philosophie. Département de Chimie. Université de Toronto. 298 p.
- Franck, K. (2008).** Contrôle de qualité des comprimés non enrobés cas d'un générique et d'un princeps de doxycycline. Thèse pour l'obtention du Doctorat en Pharmacie. Faculté de médecine et de pharmacie –Rabat. Université Mohammed. 58 p.
- François, M. (2003).** Histoire de la trachéotomie The history of tracheotomy. 18 p.
- Freeman, V. J. (1951).** Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of bacteriology*, 61(6), 675-688.
- Gachelin, G., Yves, B., Annick, O., Philippe, R., et Patrice, B. (2013).** La naissance des biotechnologies pharmaceutiques en France (1887-1914). Le sérum antidiphthérique de l'Institut Pasteur. Presses Universitaires de France.
- Galazka, A., Milstien, B., Robertson, E. et Cutts, T. (1993).** Les bases immunologiques de la vaccination. Genève: Organisation mondiale de la Santé. 01- 04 p.
- Galazka, A., et Robertson, S. (1995).** Diphtheria: changing patterns in the developing world and the industrialized world. *European journal of epidemiology*, 11(1), 107-117.
- Galazka, A., Robertson, S., et Oblapenko, G. (1995).** Resurgence of diphtheria. *European journal of epidemiology*, 11(1), 95-105.
- Galli, S., et Tsai, M. (2012).** IgE and mastcells in allergic disease. *Nature medicine*, 18(5), 693-704.

- Garin-Bastuji, B. (1992).** Contrôle officiel du vaccin Rev 1 en France. Modalités, critères, sanction. Prevention of brucellosis in Mediterranean countries (M. Plommet, ed.). Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, 176-181.
- Gauriat, M. (2012).** Connaissance des facteurs déterminants dans la conduite d'un procédé pour la production de toxine par *Corynebacterium diphtheriae* utilisée dans la formulation de vaccins. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en médecine. Faculté de Médecine. Université Toulouse. INSA. 51 p.
- Gennari, F. J. (1984).** Serum osmolality: uses and limitations. New England Journal of Medicine, 310(2), 103.
- Gentilini, M., et Duflo, B. (2012).** Médecine tropicale, 6ed. Paris: Lavoisier. 613 p.
- Getzoff, E., Tainer, J., Lerner, R., et Geysen, H. (1988).** The chemistry and mechanism of antibody binding to protein antigens. In Advances in immunology. Academic Press, 43, 1-98.
- Getzoff, E. D., Tainer, J. A., Lerner, R. A., et Geysen, H. M. (1988).** The chemistry and mechanism of antibody binding to protein antigens. Academic Press. In Advances in immunology, 43, pp. 1-98.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H., Trujillo, M., Suzuki, K., Ludwig, W., et Whitman, W. (2012).** Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology Volume Five The Actinobacteria. Part A and B .Springer New York. 1987 p.
- Guerra, A. (2008).** Métrologie sensorielle dans le cadre du contrôle qualité visuel. Thèse pour obtenir le diplôme de Docteur en Génie industriel. Université De Savoie, 39 p.
- Guillou, H., Pelissier, J. et Grappin, R. (1986).** Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. Le lait, 66(2), 143-175.
- Hallouët, P., Dagherne, G., et Yhuel, V. (2019).** L'intégrale. Diplôme IFSI: en 6 semestres. Elsevier Health Sciences. 406 p.
- Hatanaka, A., Tsunoda, A., Okamoto, M., Ooe, K., Nakamura, A., Miyakoshi, M., et Takahashi, M. (2003).** *Corynebacterium ulcerans diphtheria* in Japan. Emerging infectious diseases, 9(6), 752.

- Haut conseil de la santé publique. (2011).** Conduite à tenir lors de l'apparition d'un cas de diphtérie. Rapport, 22 p.
- Holmes, R. K. (2000).** Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. *Journal of Infectious Diseases*, 181(Supplement_1), S156-S167.
- Houari, M. (2017).** Vaccins: Actualité et Exigences en Contrôle Qualité. Thèse pour l'Obtention d'un diplôme d'état de Docteur en Pharmacie. Rabat. Maroc. 88-118 p.
- Huygen, K. (2016).** Development of human monoclonal antibodies to diphtheria toxin. A solution for the increasing glack of equine DAT for therapeutic use?. *Virulence*, 7(6), 613-615.
- Hygis, N. (1998).** Hygiène hospitalière. Presses Universitaires Lyon. 359 p.
- Jawetz, E., Melnick, J., et Adelberg, E. (1973).** Microbiologie médicale. Presses Université Laval. 417 p.
- Jebalia, R., Abbès, S., Salah, J., Younesa, R., et Oueslatia, R. (2014).** Possibilité de prévention des effets toxiques des Aflatoxines (B1 et M1) chez la souris Balb/C par une bactérie lactique *Lactobacillus plantarum* MON03.
- Kaba, M. (2004).** Diphtheria in Geneva at the end of the 19th century: the emergence of bacteriology and the use of serotherapy. *Gesnerus*, 61(1-2), 37-56.
- Khajuria, A., et Krahn, J. (2005).** Osmolality revisited—deriving and validating the best formula for calculated osmolality. *Clinical biochemistry*, 38(6), 514-519.
- Kierszenbaum, A. (2006).** Histologie et biologie cellulaire : Une introduction à l'anatomie pathologique. De Boeck Supérieur. 269 p.
- Krifi, M. N. (2017).** Naissance et essor de la vaccinologie et de l'immunothérapie. ISTE Group.
- Kotz, J. C. et Treichel J. P. M. (2006).** Chimie des solutions. De Boeck Supérieur. 197 p.
- Hammoudi Triki, D. (1999).** Purification et caractérisation des fragments f (AB') 2 A PARTIR D'un sérum anti-scorpionique. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, 63.
- Le Hir (a). (2001).** Comprimés. In : Abrégés de pharmacie galénique. Bonnes pratiques de fabrication des médicaments, 8ème édition. Masson. 251-277 p.

- Le Hir (b). (2001).** Contrôle de répartition dans les préparations présentées en unités de prises.
In : Abrégés de pharmacie galénique. Bonnes pratiques de fabrication des médicaments,
8ème édition. Masson. 238-240 p.
- Leach, S. J., et Scheraga, H. A. (1980).** Effect of light scattering on ultraviolet differences
pectra. Journal of American Chemistry Society, 82, 4790–4792.
- Lebranchu, Y. (2018).** Histoire des anticorps thérapeutiques. 02 p.
- Leclerc, J. (2011).** La vaccination : histoire et conséquences épidémiologiques, Thèse
d'obtention d'un diplôme d'état de Docteur en pharmacie. Faculté de pharmacie.
Université de Limoges. 40 p.
- Letonturier, P. (2007).** Immunologie générale. Elsevier Masson. 03 p.
- Levieux, D., et Bezard, G. (1974).** Immunoglobulines bovines et brucellose. Purification des
immunoglobulines et préparation de leurs antisérums spécifiques, 329-342.
- Liebl, W. (2006).** *Corynebacterium* non-medical. The prokaryotes. New York, USA. Springer,
796-818.
- Littré, E. (1889).** Dictionnaire de la langue française : contenant... la nomenclature... la
grammaire... la signification des mots... la partie historique... l'étymologie.. (Vol. 3).
Hachette. 1170 p.
- London, E. (1992).** Diphtheria toxin: membrane interaction and membrane translocation."
Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Reviews on Biomembranes 1113(1), 29.
- Louis, L. A. (1951).** Dosage des protéines dans le sérum sanguin, 457-470.
- Lyng, J. (1990).** Quantitative estimation of diphtheria and tetanus toxoids. 4. Toxoids as
international reference materials defining Lf-units for diphtheria and tetanus toxoids.
Biologicals, 18(1), 11-17.
- Male, D. (2019) :** Immunologie : Aide mémoire illustré, De Boeck Supérieur. 09 p.
- Mandlik, A., Swierczynski, A., Das, A., et Ton, H. (2007).** *Corynebacterium diphtheriae*
employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells. Molecular
microbiology, 64(1), 111-124.

- Maurice, P. D. (1920).** Sur le croup diphtérique à forme foudroyante dans la fièvre typhoïde, oedème malin diphtérique du larynx, *Acta Oto-Laryngologica*, 2(3), 422-433.
- Mcgonagle, D., et Mcdermott, M. F. (2006).** A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS Med*, 3(8), 297.
- McLeod, J. W. (1943).** The types mitis, intermedius and gravis of *corynebacterium diphtheriae*: A Review of Observations during the Past Ten Years 1. *Bacteriological Reviews*, 7(1), 1.
- Mendham, J. (2005).** Analyse chimique quantitative de Vogel. De Boeck Supérieur, 569 p.
- Michalowicz, J., et Duda, W. (2007).** Phenols--Sources and Toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies*. University of Łódź.Faculty of Biology and Environment Protection, 16(3), 348-353.
- Mian, I. S., Bradwell, A. R., et Olson, A. J. (1991).** Structure, function and properties of antibody binding sites. *Journal of molecular biology*, 217(1), 133-151.
- Mondiale de la Santé, O. (2013).** Système de gestion de la qualité au laboratoire : manuel. 77 p.
- Mpondo, C. (2017).** Évaluation de la compatibilité des injectables avec les matériaux en contact : analyse de risque extractibles et relargables. Thèse en vue du diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Rennes 1 sous le sceau de l'université Bretagne Loire. 23 p.
- Nicolas, J. F., et Thivolet, J. (1998).** Immunodermatologie: compte-rendu du séminaire 1998, amphithéâtre Pierre Croizat, Institut Pasteur de Lyon, 13-15 mai 1998. John Libbey Eurotext. 91 p.
- Nouar, S. (2015).** Les anticorps monoclonaux comme biosimilaires thérapeutiques: cibles, modes d'actions et aspects pharmaco-économiques. Thèse pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie. Faculté de pharmacie de Grenoble. Université Joseph Fourier. 39 p.
- Nowotny, A. (1979).** Double Gel Diffusion/Ouchterlony Method. In *Basic Exercises in Immunochemistry* Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 232-234.

- Nungester WJ., Hood, M., et Warren, M. (1943).** Use of Thioglycollate Media for Testing Disinfectants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 52(4), 287-289.
- Ott, L., et Burkovski, A. (2014).** Toxigenic corynebacteria: adhesion, invasion and host response. In *Corynebacterium diphtheriae and related toxigenic species*. Springer, Dordrecht, 143-170.
- Pailoux, E. (1981).** Organisation du système immunitaire félin. Thèse pour obtention d'un diplôme d'état de docteur en médecine vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire De Lyon. Université Claude-Bernard-Lyon I. 53 p.
- Palya, V. (1992).** Manual for the production of Marek's disease, Gumboro disease and inactivated Newcastle disease vaccines. French. Etude FAO: Production et Santé Animales (FAO). no. 89.
- Patey, O., et Dellion, S. (1999).** La diphtérie et les infections liées à *Corynebacterium diphtheriae* en 1997. *La Revue de médecine interne*, Elsevier. Paris, 20(1), 40-41.
- Pebret, F. (2004).** Dictionnaire professionnel de la visite médicale : suivi de l'initiation au vocabulaire médical. Heures de France. 14 p.
- Pebret, F. (2003).** Maladies infectieuses : toutes les pathologies des programmes officiels des études médicales ou paramédicales. Heures de France. 166 p.
- Pittman, M. (1946).** A study of fluid thioglycollate medium for the sterility test. *Journal of bacteriology*, 51(1), 19.
- Pollender, J. (1983).** Effet des membranes plasmiques de foie sur l'actine. Université du Québec à Trois-Rivières. 44 p.
- Pont, E. (2011).** Contrôle des impuretés dans les substances pour usage pharmaceutique selon la Pharmacopée Européenne (évolution des connaissances et des méthodes analytiques de contrôle). Thèse pour obtention de diplôme d'état de docteur en pharmacie de l'université de Limoges. France. 12 p.
- Prescott, L., Willey, J., Sherwood, L., et Woolverton, C. (2014).** *Prescott's microbiology*. McGraw-Hill Education. 739 p.

- Radut, D. (2013).** Vivant entre deux mondes. Société des Ecrivains. 187 p.
- Revillard, J. (2001).** Immunologie, De Boeck Supérieur. 17 p.
- Rey, M., Patey, O., et Vincent, F. (1996).** Retour de la diphtérie en Europe, *Eurosurveillance*, 1(2).14-16.
- Ritvo, P. (2017).** Au cœur du contrôle de l'immunité humorale : définition, mode d'action et répertoire des lymphocytes T folliculaires régulateurs, Sorbonne Paris Cité. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences de l'Université Paris V. Ecole doctorale. 12 p.
- Riegel, P. (1998).** Les corynébactéries, aspects bactériologiques et cliniques. In *Annales de Biologie Clinique*, Paris, Expansion scientifique française, Vol. 56, No. 3, pp. 285-296.
- Rodat, A. (2009).** Mise au point d'un système CE-LIF intégré et application à l'analyse de biomolécules. Thèse en vue de l'obtention du Doctorat. Université Toulouse III-Paul Sabatier. 43 p.
- Rouillard, S. (2004).** Développement de méthodes impédancemétriques et biochimiques pour la détection rapide d'une faible contamination bactérienne en milieu liquide complexe ? Thèse pour obtenir le grade Docteur en Microbiologie Appliquée. Institut National Agronomique Paris-Grignon. 49 p.
- Rule, P. (1997).** Measurement of microbial activity by impedance. In *ift basic symposium series* (vol. 12, pp. 305-314). Marcel dekker, inc.
- Rumelhard, G. (1990).** Le concept de système immunitaire. Aster. 12 p.
- Salas-Solano, O., Tomlinson, B., Du, S., Parker, M., Strahan, A., et Ma, S. (2006).** Optimization and validation of a quantitative capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate method for quality control and stability monitoring of monoclonal antibodies. *Analytical chemistry*, 78(18), 6583-6594.
- Schroeder, H., et Cavacini, L. (2010).** Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S41-S52.

- Selim, S. A., Mohamed, F. H., Hessain, A. M., et Moussa, I. M. (2016).** Immunological characterization of diphtheria toxin recovered from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(2), 282-287.
- Senouci, H., Lounici, M. et Rahal, k. (2004).** Antidiphtheria immunity of the Algerian population: a seroepidemiological study *Médecine et Maladies Infectieuses*, 34(7), 316.
- Sharma, B., Joseph, A. et Sood, A. (2008).** A simple and rapid method for quantifying 2-phenoxyethanol (2-PE) in Diphtheria, Tetanus and w-Pertussis (DTwP) vaccine. *Biologicals*, 36(1), 61-63.
- Sidibé, O. (2011).** Contrôle de qualité des médicaments antipaludiques dans sept régions (O7) administratives du Mali par Chromatographie sur Couche Mince (CCM): Opérationnalisation des kits minilabs. Thèse Pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat). 21 p.
- Skoog, D., et West, D. (2015).** Chimie analytique. De Boeck Supérieur. 388 p.
- Smith, H., Saia, G., Lobikin, M., Tiwari, T., Cheng, S., et Molrine, D. (2017).** Characterization of serum anti-diphtheria antibody activity following administration of equine anti-toxin for suspected diphtheria, Human vaccines & immunotherapeutics, 13(11), 2738-2741.
- Soubeyrand, B. (2018).** De la fabrication d'un vaccin à sa mise à disposition en pharmacie. *Revue Des Maladies Respiratoires*, 35(10), 1005-1019.
- Stellmann, C., Mirchamsy, H., Giraud, M., Favre, H., Santucci, J., et Gilbert, H. (1969).** Production et contrôle de vaccins inactivés contre la Peste équine. *Archives of Razi Institute*, 22(1), 35-55.
- Tejiozem, G. (1983).** Utilisation des produits biologiques d'origine équine en thérapeutique humaine. Doctoral dissertation, Université Cheikh Anta Diop De Dakar. 45 p.
- Theakston, R., Warrell, D., et Griffiths, E. (2003).** Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*, 41(5), 541-557.
- Theodorides, J. (1986).** A propos d'un centenaire : Gaston Ramon (1886-1963), de l'Académie des sciences, historien de la microbiologie. *Histoire des sciences médicales*, 20(4), 475-485.

- Thraenhart, O. (1989).** Evaluation de l'innocuité et de l'activité des vaccins antirabiques. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 8(4), 845.
- Tortora, G., et Derrickson, B. (2017).** Manuel d'anatomie et de physiologie humaines. De Boeck supérieur. 495 p.
- Uchida, T., Gill, D., et Pappenheimer, A. (1971).** Mutation in the structural gene for diphtheria toxin carried by temperate phage β . *Nature New Biology*. 233(35), 9.
- Umata, T., Sharma, K., et Mekada, E. (2000).** Diphtheria toxin and the diphtheria-toxin receptor. *Bacterial Protein Toxins*, Springer. 45-46.
- Variot, G. (1898).** La diphtérie et la sérumthérapie : études cliniques faites au pavillon bretonneau. Maloine. 214 p.
- Vallery, P. (1938).** Les anatoxines. *Revue des Deux Mondes (1829-1971)*, 48(4), 919-931.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., et Rispens, T. (2014).** IgG subclasses and allotypes: from structure to effect or functions. *Frontiers in immunology*, 5, 520.
- Wagner, K., Stickings, P., White, J., Crowcroft, N., Sesardic, D., et Efstratiou, A. (2009).** A review of the international issues surrounding the availability and demand for diphtheria antitoxin for therapeutic use. *Vaccine*, 28(1), 15.
- Wallraff, E., Wachs, E., et Waite S. (1968).** Antigenic analysis of coccidioidins by qualitative and quantitative immunodiffusion techniques. *American Review of Respiratory Disease* 97(3), 406-414.
- Watier, H. (2009).** De la sérothérapie aux anticorps recombinants «nus»-Plus d'un siècle de succès en thérapie ciblée. *médecine/sciences*, 25(12), 999-1009.
- Weill, B., et Batteux, F. (2003).** Immunopathologie et réactions inflammatoires. De Boeck Supérieur. 21 p.
- WHO: World Health Organisation (1973).** Diphtheria= Diphtérie, *Weekly Epidemiological Record Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 48(36), 355.
- WHO: World Health Organisation (1977).** Manual for the production and control of vaccines : diphtheria toxoid, Geneva. 64 p.

- WHO : World Health Organisation (1998).** Assurance de la qualité des produits pharmaceutiques, Recueil de directives et autres documents, 1, 11-13.
- WHO: World Health Organisation (2006).** Diphtheria vaccine= Vaccin antidiphtérique, Weekly Epidemiological Record Relevé épidémiologique hebdomadaire, 81(03), 28.
- WHO: World Health Organisation (2013).** Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines, 147-155.
- WHO: World Health Organisation (2017).** Diphtheria vaccine: WHO position paper August 2017 Vaccin antidiphtérique: Note de synthèse de l'OMS–août 2017, Weekly Epidemiological Record. Relevé épidémiologique hebdomadaire, 92(31), 417-435
- Wilson, M., et Pringle, B. (1955).** Interpretation of the Ouchterlony precipitin test. Journal of Immunology, 75(6), 460-469.
- Winau, F., et Winau, R. (2002).** Emil von Behring and serumtherapy. Microbes and Infection 4(2), 185-188.
- Wu, H., et Fives, P. (2001).** Molecular strategies for fimbrial expression and assembly; Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 12(2), 101.
- Wytzman, R. (02/2003).** Rapport global microbiologie/sérologie/parasitologie enquête. 19 p.
- Yeung, M. (1999).** Molecular and genetic analyses of *Actinomyces* spp. Critical Reviews in Oral Biology&Medicine 10(2), 120.
- Zheng, H., Mao, Y., Li, D. et Zhu, C. (2003).** Dye-binding protein assay using a long-wave-absorbing cyanine probe. Analytical biochemistry, 318(1), 86-90.

Site internet

- Lien1.** <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/bacilles-gram-positifs/dipht%C3%A9rie>. Consulter le 05/06/2020.
- Lien2.** <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/bacilles-gram-positifs/dipht%C3%A9rie>. Consulter le 05/06/2020.
- Lien3.** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Consulter le 19/09/2020.

Lien4.https://www.jfmed.uniba.sk/fileadmin/jlf/Pracoviska/ustav-mikrobiologie-a-imunologie/CORYNEBACTERIA__Bordetella. Consulter le 12/06/2020.

Lien 5. https://www.assistancescolaire.com/enseignant/lycee/ressources/base-documentaire-en-svt/t_t208i02. Consulter le 28/07/2020.

Lien6.<https://www.fishersci.fr/shop/products/osmometers/11930697>. Consulter le 05/07/2020.

Lien7.http://ressources.unisciel.fr/formulation_cosmetique/co/1-3.html. Consulter le 28/07/2020.

Lien 8. <https://pasteur.dz/fr/> .Consulter le 20/05/2020.

Lien9. <https://www.fishersci.es/shop/products/bd-bbl-mycoflask-thioglycollate-fluid-prepared-media-5/12830693>. Consulter le 24/05/2020

Lien 10. <https://www.omicsonline.org/articles-images/2157-7145-6-290-g002.html>. Consulter le 25/08/2020.

Lien11. who.int/immunization/newsroom/thiomersal_information_sheet/fr/. Consulter le 25/06/2020

Lien12.<https://www.industriepharma.fr/les-methodes-rapides-et-traditionnelles-s-equilibrent,75746>. Consulter le 18/09/2020.

Annexes

Annexe 1 : Calendrier de vaccination en Algérie.

Vaccin \ Âge	Naissance	2 mois	3 mois	4 mois	11 mois	12 mois	18 mois	6 ans	11-13 ans	16-18 ans	Tous les 10 ans à partir de 18 ans
BCG	BCG										
HVB	HVB										
VPO	VPO	VPO		VPO		VPO		VPO	VPO		
DTC-Hib-HVB		DTC Hib HVB		DTC Hib HVB		DTC Hib HVB					
Pneumocoque		Pneumo-coque		Pneumo-coque		Pneumo-coque					
VPI			VPI								
ROR					ROR		ROR				
DTC								DTC			
dT Adulte									dT Adulte	dT Adulte	dT Adulte

BCG : tuberculose, HVB : hépatite B, VPO : poliomyélite orale, DTC-Hib-HVB : Diphtérie-Tétanos-Coqueluche-Haemophilus influenzae type b-Hépatite B, VPI : poliomyélite injectable, ROR : Rougeole-Oreillons-Rubéole, DTC : Diphtérie Tétanos Coqueluche, dT Adulte : diphtérie Tétanos Adulte

Annexe 2 : Milieu Soybean Casein

- Tryptone..... 17,0 g
- HiVeg hydrolysat 17,0 g
- Peptone papaïnique de soja.....3,0 g
- Extrait de viande 6,0 g
- Extrait de levure..... 6,0 g
- Glucose..... 2,5 g
- Phosphate di potassique2,5 g
- Chlorure de sodium5,0 g
- Eau distillée.....1 000 ml
- pH du milieu 7,3 prêt à l'emploi à 25°C.

Annexe 3 : Milieu liquide thioglycolate

- L-Cystine.....0,5 g
- Chlorure de sodium.....2,5 g
- D-Glucose monohydrate (C₆H₁₂O₆H₂O).....5,5 g
- Agar en granules (< 15% d'humidité).....0,75 g
- Extrait de levure (soluble dans l'eau).....5,0 g
- Peptones pancréatiques de caséine.....15,0 g
- Acide thioglycolate.....0,3 ml
- Solution sodique de résazurine.....1 ml
- Eau distillée.....1 000 ml

Annexe 4 : Matériel utilisés

- ✚ Un spectrophotomètre UV/Visible
- ✚ Un agitateur magnétique (VORTEX)
- ✚ Un pH mètre
- ✚ Des barreaux magnétiques
- ✚ Des cuves en plastique
- ✚ Des fioles
- ✚ Des tubes à essai
- ✚ Des embouts
- ✚ Des micropipettes
- ✚ Des boîtes en plastiques 11cm x 8cm
- ✚ Un emporte-pièce (4mm)
- ✚ Des pipettes de 5ml
- ✚ Un pipetus (pipettes automatique)
- ✚ Une centrifugeuse
- ✚ Des tubes à essais
- ✚ Une éprouvette
- ✚ Un ballon de 1 Litre
- ✚ Des plaques en verre de 7 cm x 5 cm
- ✚ Du papier absorbant
- ✚ Du papier aluminium
- ✚ Une balance de précision 0.03 g



Figure A : Le matériel utilisé dans le laboratoire (Photographie originale)

- ✚ Bain-marie thermostaté sous agitation ou Micro-ondes
- ✚ Agitateur magnétique chauffant
- ✚ Table à niveau
- ✚ Plateau à agitation mécanique
- ✚ Séchoir à main
- ✚ Des cages pour les souris

Annexe 5 : Réactifs et colorants

▪ Réactifs biologiques

- ✚ Sérum à examiner
- ✚ Sérum de référence
- ✚ Vaccin de référence
- ✚ BSA : Sérum d'albumine bovine
- ✚ Contrôle positifs et négatifs
- ✚ Souris blanche de laboratoire
- ✚ Nourriture pour les souris

▪ Réactifs non biologiques

- ✚ NaCl à 9 g /l
- ✚ Sulfate e cuivre
- ✚ Citrate de sodium
- ✚ Carbonate de sodium
- ✚ Agarose
- ✚ Bleu de coomassie
- ✚ Chlorure de sodium
- ✚ Phosphate disodique 12 H₂O
- ✚ Phosphate de sodium
- ✚ Azide de sodium
- ✚ Eau distillée
- ✚ solution de chlorure de sodium R à 9 g/L.



Figure B : Matériel biologique utilisé
(Photographie originale)

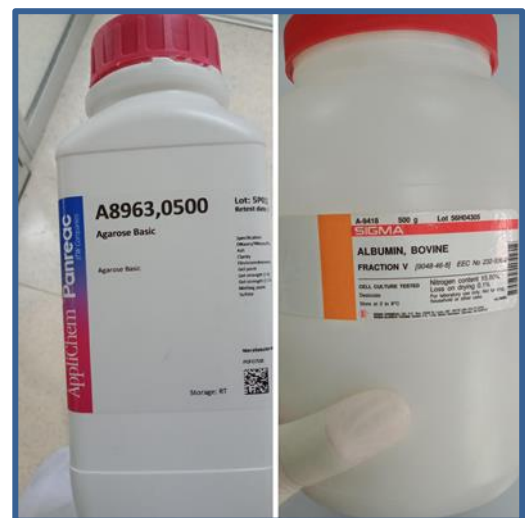


Figure C : Les réactifs utilisés
(Photographie originale)

Annexe 6 : Sérum antidiphtérique B.P

- + Nom : Antitoxine Diphtérique B.P.
- + Volume : 10 ml.
- + Dose : Uni dose.
- + Type : produit immunologique injectable.
- + Voie : intramusculaire.
- + Fabriqué : VINS bioproducts.
- + Pays producteur : India.

Chaque ml contient :

- Enzyme raffinée, fragments d'immunoglobuline.
- Antitoxine diphtérique équine pas moins de 1000 U.I.
- Préservateur : Crésol B.P moins de 2,5% v/V.
- Excipients : Chlorure de Sodium B.P
- Stabilisateur : Glycine B.P
- Conserver entre 2°C et 8°C (ne pas congeler).

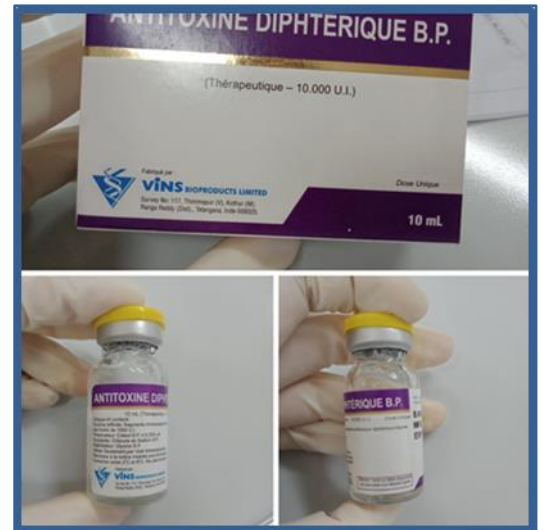


Figure D : Antitoxine diphtérique B.P

(Photographie originale)

Annexe 7 :

Milieu de culture - Milieu liquide thioglycolate (Annexe 3).

Composition des réactifs et colorants

Annexe 8 : Solution NaOH à 6%

- NaOH6 g
- Eau d'estillée (QSP).....100 ml

Annexe 9 : Protocole de préparation du réactif biuret

-Dissolvez 3,46 g de sulfate de cuivre dans 10 ml d'eau distillée chaude, puis laissez refroidir (solution A).

-Dissolvez 34,6 g de citrate de sodium R et 20,0 g de carbonate de sodium anhydre R dans 80 ml d'eau distillée R chaude, puis laissez refroidir (solution B).

-Mélangez les solutions A et B, puis complétez à 200 ml avec de l'eau distillée R. Ce réactif doit être utilisé dans les 6 mois qui suivent sa préparation ; il ne doit pas être utilisé si le développement d'un trouble ou l'apparition d'un précipité sont observés.

Annexe 10 : protocole de préparation de la solution de référence

-Dissolvez la substance de référence (albumine bovine BSA) à 10 mg /ml (1%) correspondant à la protéine à doser dans une solution de chlorure de sodium à 9 g/L.

-Prélevez des échantillons de cette solution et complétez-les avec une solution de chlorure de sodium R à 9 g/L de façon à obtenir au moins trois solutions de référence différentes, de concentrations comprises entre 0,5 mg/ml et 10 mg/ml et uniformément réparties sur l'intervalle choisi.

Annexe 11 : Solution alcaline tamponnée pH à 9.8 :

- Na₂CO₃ anhydre.....6,3 g
- NaHCO₃3,36 g
- Eau stérile 800 ml
- Eau stérileQSP 1000 ml
- Ajuster à pH 9,8 avec HCL (37%)
- A conserver à +4°C

Annexe 12 : Solution de 4-amino-antipyrine :

- 4-amino-antipyrine3 g
- Eau stérileQSP 1000 ml
- A conserver à + 4°C en verrerie ombrée

Annexe 13 : Solution de ferricyanure de potassium :

- Ferricyanure de potassium12 g
- Eau stérile..... QSP 1000 ml
- A conserver à +4°C en verrerie ombrée

Annexe 14 : Solution de phosphate de potassium :

- KH₂PO₄136 g
- Eau stérile..... QSP 1000 ml

Annexe 15 : Solution étalon du tricrésol

- Tricrésol1 g
- HCL.....QSP 1000 ml

Annexe 16 : Solution de tampon phosphate buffered saline PBS à pH 7,25

- Chlorure de sodium7,2 g
- Phosphate disodique 12H₂O8,5 g
- Phosphate de potassium0,38 g
- Aside de sodium0,5 g

Annexe 17 : Solution de décoloration

- Acide acétique.....100 ml
- Methanol450 ml
- Eau distillée.....450 ml

Annexe 18 : Colorant de bleu de Coomassi R 250

- Bleu de coomassi.....0,8 g
- Solution décolorante.....200 ml

Annexe 19 : Valeurs de l'absorbance lu par spectrophotomètre à 545 nm.

	Absorbance	Concentration	La moyenne	Ecart-type
Blanc	0			
Standard	1,19			
S1	1,36	11,42	11,25	0,14
S2	1,33	11,17		
S3	1,33	11,17		

Annexe 20 : Valeurs de l'absorbance lu par spectrophotomètre à 506 nm.

	Absorbance	Concentration	La moyenne	Ecart-type
Blanc	0			
Standard	0,538			
S1	0,333	1,50	1,51	0,02
S2	0,335	1,51		
S3	0,340	1,53		

Résumé

La diphtérie à longtemps été une maladie endémiquemortelcausé par des souches toxigènes de *Corynebacterium*. Le traitement de la diphtérie nécessite l'administration précoce d'antitoxine diphtérique (DAT), une immunoglobulinequi neutralise la toxine diphtérique en circulation. L'acquisition de ces immuno-sérums nécessite un contrôle de la qualité comme aspect essentiel de la sécurité avantla libération de chaque lot. Après une série de tests réalisée sur une antitoxine diphtérique importé, les résultats obtenue indique que la concertation en protéine totale de $11,25 \pm 0,02$ mg/ml, Un pH de $6,5 \pm 0,01$, un volume extractible de 10 ml présent dans le flacon, une concentration de préservateur Crésol de (0,15%), un test d'identité positive, et ainsi qu'une absence totale de germes. En fin un test de toxicité négative prouvant l'innocuité du produit. L'étude du contrôle du sérum sur l'ensemble est conforme aux exigences décrite par la documentation. Cependant un complément de recherche est recommandé pour déterminer la conformité et l'efficacité totale du produit.

Mot clés : Diphtérie, *Corynebacterium*, Sérothérapie, Contrôle qualité du DAT .

Abstract

Diphtheria has been for long a deadly endemic disease caused by toxigenic strains of *Corynebacterium*. Diphtheria treatment requires early administration of diphtheria antitoxin (DAT), an immunoglobulin that neutralizes circulating diphtheria toxin. The acquisition of these immuno-sera requires quality control as an essential aspect of security before the release of each batch. After a series of tests carried out on an imported diphtheria antitoxin, the results obtained indicate that the total protein concentration 11.25 ± 0.02 mg / ml, A pH of 6.5 ± 0.01 , an extractable volume 10 ml present in the bottle, a concentration of Cresol preservative (0.15%), a positive identity test, and as well a total absence of germs. Finally a negative toxicity test proving the safety of the product. The study of serum control over the whole complies with the requirements described in the documentation. However, further research is recommended to determine the conformity and total effectiveness of the product.

Keywords: Diphtheria, *Corynebacterium* diphtheria, Serotherapy, Quality control of DAT.

ملخص

كانت الخناق لفترة طويلة مرضًا متوسطًا مميًا تسببه سلالات تسمية من *Corynebacterium* يتطلب علاج الدفتيريا الإغناء المبكر لمضاد السموم للخناق (DAT) ، وهو جلوبيولين مناعي يحيد تداول سم الدفتيريا. يتطلب الحصول على هذه الأمصال المناعية مراقبة الجودة كجانب أساسي من الأمن قبل إطلاق كل دفعة. بعد سلسلة من الاختبارات التي تم إجراؤها على مضادات السموم الدفتيريا المستوردة ، تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن إجمالي تركيز البروتين 11.25 ± 0.02 مجم / مل ، درجة حموضة 6.5 ± 0.01 ، حجم قابل للاستخراج 10 مل موجود في الزجاج ، تركيز كريزول مادة حافظة (0.15%) ، واختبار هوية إيجابية ، وغياب كامل للجراثيم. أخيرًا ، اختبار سمية سلبي يثبت سلامة المنتج. تتوافق دراسة التحكم في المصل على الكل مع المتطلبات الموضحة في الوثائق. ومع ذلك ، يوصى بإجراء مزيد من البحث لتحديد مدى مطابقة المنتج وفعاليتة الكلية.

الكلمات المفتاحية: الخناق ، الخناق الوتدية ، المعالجة المصلية ، ضبط الجودة لـ DAT .