



680THV-2

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOC

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA



FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES ET BIOLOGIQUE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME
D'INGENIEUR D'ETAT EN BIOLOGIE

Option :
CONTRÔLE DE QUALITE ET ANALYSES

Thème

Contrôle de la qualité du vaccin DT coq Diphthérie, Tétanos et Coqueluche

Présenté par :

IBOUZIDENE SARRA

Date de soutenance :

13 /10/ 2011

Salle de soutenance : C₄ à 9h30

Devant le jury :

- M ^{elle} SAAD.L	Maitre Assistante A	USDB	Examinatrice
-M ^{elle} AMAROUCHE.N	Maitre-assistante A	USDB	Examinatrice
-M ^{elle} ANANE.A	Maitre-assistante A	USDB	Examinatrice
-Mr KEZZAL.S	pharmacien	IPA	Promoteur
-M ^{elle} AMOKRANE.A	Maitre Assistante A	USDB	Co-promotrice

Promotion
2010-2011

DEDICACE

Ce modeste travail est le fruit de tant d'années de sacrifice, je le dédie à tous ceux que j'aime grands et petit, spécialement :

- Ma chère mère pour sa gentillesse, son affection, sa douceur, sa tendresse, ses encouragements éternels et sans elle rien n'aurait pu être possible.*
- Mon cher père pour son encouragement, sa patience, son aide continuel sur le long chemin de mes études et son soutien financier.*

*Je leur souhaite le bonheur et la bonne santé, **qu'Allah me les garde.***

A mon très chers frère : LOTFI qui ma vraiment aidé, je le souhaite une bonne continuation dans ces études.

A ma très chère cousine HADJER

A mes amis : NABIL et YACINE.

*A mes très chères amies : NADJIA, SOUMIA, HAFSA, FATIHA, MERIEM, RAOUIA
Qui mon encouragé de loin et de prés pour la réalisation de ce mémoire.*

A tous les étudiants de la promotion 2010-2011, surtout ceux de l'option contrôle de qualité et analyses.

SARRA

REMERCIEMENT

Je tiens en premier lieu à remercier le bon Dieu, le clément et le miséricordieux de m'avoir ouvert les portes de savoir et guider mes pas vers la réussite, et de m'avoir donné la force et la patience pour réaliser ce modeste travail.

Mes sincères remerciements vont à :

M^r KEZAL S. Mon promoteur, de m'avoir proposé ce thème et, aussi pour son soutien, son aide précieuse ainsi que ses conseils judicieux.

M^{elle} AMOKRANE A. Ma co-promotrice, pour son aide conséquente ainsi que ses orientations contribuant.

J'exprime mes remerciements aux honorables membres de jury :

M^{elle} SAADI.L : qui ma fait l'honneur de présider ce jury ;

M^{elle} AMAROUCHE.N et M^{elle} ANANE.A : d'avoir aimablement acceptées d'examiner ce travail.

Je remercie également tous le personnels de l'Institut Pasteur d'Algérie, en particulier :

M^r NOUAS, M^{elle} AHLEM, M^{me} MOUNIA, M^r SID AHMED, M^r MAHMOUD,

M^{elle} LILA, M^{elle} CHAHINEZ, M^{elle} AMEL, M^{me} ISMA, M^r DASSA YUCEF.

A M^r BEN MAALEM qui ma beaucoup aidé et encouragé.

Je tiens enfin à remercier tous les enseignants du département de Biologie, qui ont contribués de prés ou de loin à notre formation

Résumé

Le vaccin DT coq est un produit injectable, utilisé dans la prévention de trois maladies : diphtérie, tétanos, coqueluche.

En Algérie, le vaccin DTcoq est importé, afin de s'assurer de la bonne qualité de ce vaccin, chaque lot est soumis à un contrôle de qualité au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Dans cette optique, nous avons réalisé plusieurs contrôles consistant à déterminer par des méthodes préétablies et validées la conformité du produit aux normes de l'OMS et de la Pharmacopée Européenne. Pour cela les résultats trouvés indiquent que le vaccin DTcoq est conforme aux normes exigées donc utilisable pour la santé publique à savoir :

Le contrôle physico-chimique des différents paramètres : (aspect, pH, NaCl, thiomersal, aluminium) dont les résultats étaient conformes aux normes exigées par la pharmacopée européenne et l'OMS.

Le contrôle immunologique (test d'identité) dont le résultat nous a permis d'identifier le principe actif du vaccin.

Le contrôle microbiologique (test de stérilité) dont le résultat rapporte bien que le vaccin DTcoq est bien stérile cette caractéristique est obligatoire pour l'usage parentéral.

En dernier, le résultat du contrôle toxicologique réalisé sur des animaux rapporte bien que le vaccin DTcoq n'est pas toxique.

Mots clés : Diphtérie, Tétanos, Coqueluche, Contrôle, Qualité, Vaccin DTcoq.

Summary

Vaccine DTP is an injectable product, used in the prevention of three diseases: diphtheria, tetanus, whooping-cough.

Into Algeria, the vaccine DTP is imported in order to make sure of the good quality of this vaccine, each batch is subjected to a quality control on the level of the Pasteur Institute of Algiers.

Accordingly, we carried out several controls consisting in determining by methods preestablished and validated the conformity of the product to the standards of WHO and European Pharmacopeia that's why the found results indicate that the DTP vaccine is in conformity with the standards thus required usable for the public health to know

The physicochemical control of the various parameters: (aspect, pH, NaCl, thiomersal, aluminum) whose results were in conformity with the standards required by the European pharmacopeia and WHO.

Immunological control (test of identity) whose results has identify the active principle of the vaccine .

Microbiological control (test of sterility) reports that the DTcoq vaccine is quite sterile this characteristic is compulsory for the parenteral custom.

In the last, results for the toxicological control carried out on animals brings back well that the DTP vaccine is not toxic.

Key words: Diphtheria, Tetanus, Whooping-Cough, Control, Quality, DTP vaccine.

ملخص

إن لقاح DT coq منتج للحقن هذا اللقاح المستعمل في الجزائر مستورد من الخارج . للتأكد من النوعية الجيدة لهذا اللقاح ، تجرى لكل حصة مراقبة دقيقة من طرف معهد باستور بالجزائر .

و في هذا الإطار قمنا بعدة فحوصات بطرق معتمدة ومصادق عليها وفق المعايير المعمول بها في المنظمة العالمية للصحة و الدستور الأوروبي للأدوية و قد كشفت النتائج المتوصل إليها أن اللقاح DT coq متطابق مع القيم المفروضة إذ يستعمل من طرف الصحة العمومية .

- الطريقة الفيزيوكيميائية التي كانت نتائجها مطابقة للقيم المفروضة من طرف المنظمة العالمية للصحة و معايير دستور الأدوية الأوروبي .
- الطريقة المناعية، سمحت لنا بالتأكد من فعالية اللقاح .
- الطريقة الميكروبيولوجية و أثبتت أن اللقاح معقم .
- الطريقة التسممية (توكسيكولوجية) أجريت على فئران المختبرية و أثبتت أن اللقاح لا يحتوي على سموم .

و قد كشفت النتائج المتوصل إليها أن اللقاح DT coq متطابق مع القيم المفروضة إذ يمكن استعماله من طرف الصحة العمومية.

الكلمات المفتاح : ديفتريا – الكزاز – السعال الديكي – مراقبة – نوعية – لقاح DT coq .

Glossaire

Coqueluche : La coqueluche est une maladie infectieuse due au bacille de Bordet-Gengou, ou *Bordetella pertussis*. Qui se manifeste par des accès de toux des difficultés de respiration, surtout à l'inspiration, et des vomissements provoqués par les sécrétions bronchiques ou la nourriture. Un enfant sur mille décède de la coqueluche, un traitement anti biotique ne protège pas contre les complications de la coqueluche. (OMS, 1993).

Tétanos: Le tétanos est une maladie infectieuse due à une bactérie que l'on trouve principalement dans le sol, le bacille de Nicolaier. Il se retrouve dans les intestins des mammifères et des chevaux en particulier. Lors d'une blessure, les spores du *Clostridium tetanie* pénètrent dans le corps humain à la faveur d'une coupure puis il y'a formation d'une toxine qui cause des douloureuses contractions des muscles. (OMS, 1993).

Diphthérie: La diphthérie est une maladie infectieuse qui se transmet d'une personne à l'autre par l'intermédiaire des gouttelettes de salive qui sont émises de la gorge d'un malade lorsque celui-ci tousse ou éternue. La diphthérie est généralement localisée aux amygdales, au pharynx, et au larynx, mais elle peut quelquefois avoir une localisation cutanée. (OMS, 1993).

Anticorps : Les anticorps, ou immunoglobulines, sont des glycoprotéines sécrétées par les cellules de l'immunité, capable de se combiner spécifiquement avec l'antigène ayant induits leur synthèse, d'où l'activité biologique qui résulte de cette combinaison (REGNAULT, 2002).

Antigène : Un antigène est une macromolécule naturelle ou synthétique reconnue par des anticorps ou cellules du système immunitaire et capable d'engendrer une réponse immunitaire. La plupart des Ag sont des protéines, mais il existe des Ag polysaccharidique provenant des capsules bactériennes et des Ag glycolypidiques. (REGNAULT, 2002).

Réponse à médiation cellulaire :

La réaction à médiation cellulaire combat un agent pathogène déjà à l'intérieur de la cellule, les lymphocytes T, cellules immunitaire de la réaction à médiation cellulaire, ne réagissent qu'aux déterminants antigéniques exposés à la surface cellulaire. (CHARLES et al., 2009) .

Réponse à médiation humorale

La réaction humorale se produit lorsque les lymphocytes B sont stimulés par un antigène et se divisent en plasmocytes spécifiques (clone) qui commencent à sécréter des anticorps appelés des immunoglobulines ou Ig. (CHARLES *et al.*, 2009).

Anatoxine : substance élaborée à partir d'une toxine microbienne dont on a supprimé le pouvoir toxique mais dont l'injection dans l'organisme permet à celui-ci de se défendre contre la toxine correspondante. On utilise les anatoxines pour la fabrication des vaccins. (BEYTOUT *et al.*, 2001).

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique.

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché.

DTcoq : Diphtérie, Tétanos, Coqueluche.

DO : Densité optique.

IPA : Institut pasteur d'Algérie.

ISO: International Organization of Standardization.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

pH : potentiel d'Hydrogène.

Ac : Anticorps.

Ag : Antigène.

µl : Microlitre.

UV : Ultra Violet.

TG: Thio Glycolate avec Resazurine.

TSB : Tryptone Soja Bouillon.

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique.

PBS : Phosphate Buffered Saline.

Liste des figures

Figure 1 : Présentation des flacons du vaccin DTCOQ des trois lots.....	10
Figure2: Titrage des chlorures	13
Figure3: Neutralisation d' Al^{+3} par NaOH d'où la coloration rose jaune	15
Figure4:Après titrage et l'ajout de Pyridyl Azo Naphtol.....	16
Figure 5 : Préparation de la gamme d'étalonnage.....	17
Figure 6 : Courbe d'étalonnage du thiomersal ($DO=F[C]$).....	19
Figure7: Préparation des puits dans le gel d'Agarose.....	21
Figure8: Introduction de 10 μ l de la dernière dilution dans le puit.....	21
Figure 9 : Formation des Arc de précipitation après colorations.....	22
Figure 10 : Schéma présentatif de la méthode d'ensemencement directe sur flacons.....	24
Figure 11 : Le dispositif de filtration sur le steritest.....	25
Figure 12 : Introduction du diluant à travers la membrane.....	25
Figure 13 : Introduction du vaccin	25
Figure 14: La coupure des tubulures et leur fixation sur les canistrs.....	26
Figure15:Aspect des deux milieux de cultures(TGetTSB) après incubation.....	34

Liste des tableaux

Tableau I : Types de vaccins.....	05
Tableau II : Lots de vaccins utilisés pour le contrôle.....	10
Tableau III : Tableau récapitulatif du dosage du thiomersal.....	18
Tableau IV : Résultats des paramètres physico-chimique.....	31
Tableau V : Résultats du test d'identification.....	33
Tableau VI : Résultats du test de stérilité.....	33
Tableau VII : Résultats de la toxicité anormale du lot numéro 1 du vaccin DTcoq	34
Tableau VIII : Résultats de la toxicité anormale du lot numéro 2 du vaccin DTcoq.....	35
Tableau IX : Résultats de la toxicité anormale du lot numéro 3du vaccin DTcoq.....	36
Tableau X : Résultats de la toxicité spécifique du lot numéro 1du vaccin DTcoq	37
Tableau XI: Résultats de la toxicité spécifique du lot numéro 2du vaccin DTcoq.....	37
Tableau XII: Résultats de la toxicité spécifique du lot numéro 3du vaccin DTcoq.....	37

Sommaire

INTRODUCTION.....	01
Chapitre I : Données bibliographiques.	
I-1- La vaccination :	
I-1-1- Définition du vaccin.....	02
I-1-2- Principe de la vaccination	02
I-1-3- Types de vaccins.....	03
I-2- Les bases immunologiques de la vaccination	05
I-3- Le vaccin DT coq	05
I-4- Le conservateur :thiomersal.....	06
I-5- La notion de la qualité :	
I-5-1- L'assurance de la qualité	06
I-5-1-1- Les bonnes pratiques de fabrication	07
I-5-2- La définition de la qualité	07
I-5-3- Le contrôle de la qualité.....	08
I-5-4- Le contrôle de la qualité des vaccins.....	08
Chapitre II : Matériel et méthodes :	
II-1-Matériel.....	09
II-2-Echantillonnage.....	09
II-2-3-Composition du vaccin DT coq.....	10
II-4-Méthodes :	

 -4-1- Contrôle physico-chimique.....	10
 -4-1-1- L'étude de l'aspect.....	11
 -4-1-2- La mesure du pH	11
 -4-1-3- Le dosage du Nacl par la méthode de Mohr	12
 -4-1- 4 - Le dosage de l'Aluminium	14
 -4-1-5-Le dosage du thiomersal.....	17
 -4-2- Contrôle immunologique (test d'identité).....	19
 -4-3- Contrôle microbiologique (test de stérilité).....	22
 -4-4- Contrôle toxicologique.....	27
 -4-4-1- Test de toxicité anormale.....	27
 -4-4-2- Test de toxicité spécifique.....	29
ChapitreIII : Résultats et Discussion :	
III-1-Résultats du contrôle physico-chimique.....	31
III-2-Résultats du contrôle immunologique.....	33
III-3-Résultats du test de stérilité.....	33
III-4-Résultats du contrôle toxicologique.....	34
III-4-1-Résultats de la toxicité anormale.....	34
III-4-2-Résultats de la toxicité spécifique.....	36
CONCLUSION	38
Références bibliographiques.	
ANNEXES.	

Introduction

L'entrée d'un agent pathogène dans l'organisme détermine en général une infection si les conditions sont réunies, la vaccination anti-infectieuse consiste à introduire chez un sujet une préparation antigénique dérivée ou proche de l'agent infectieux de manière à créer une réponse immunitaire capable de le protéger contre les aléas de l'infection naturelle. **(BEYTOUT *et al* ., 2001).**

Le vaccin DTcoq, désigne la diphtérie, le tétanos, la coqueluche ; c'est un vaccin qui protège contre ces maladies, c'est un vaccin associé. La vaccination se fait par trois injections du vaccin à partir du 3^{ème} à un mois d'intervalle. Un an après la 3^{ème} dose, on fait une injection de rappel selon un calendrier vaccinal: programme élargie de vaccination (PEV) préétabli par les autorités de santé. **(Calendrier vaccinal Algérien).**

Notre travail vise à contrôler la qualité du vaccin DTcoq en effectuant différents tests ; le contrôle consiste à mesurer une ou plusieurs caractéristiques du produit et à comparer les résultats obtenus à des spécifications préétablies. Il s'agit de répondre à des exigences décrites dans la pharmacopée Européenne et par l'OMS. **(OMS, 2000).** Nous avons réalisé des tests physico-chimiques qui garantissent ou non que le produit est stable en contrôlant les différents paramètres (NaCl, pH, aluminium, thiomersal), des tests immunologiques en identifiant les principes actifs du produit, des tests toxicologiques par lesquels on détermine si le vaccin est toxique ou non ainsi que la stérilité ou on détermine la présence ou l'absence de micro-organismes contaminants.

A ce jour, en Algérie, le vaccin DTcoq est importé de plusieurs pays sous forme de produit fini, et c'est au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie qu'il subit un contrôle complet visant à garantir que le niveau de qualité défini par les autorités sanitaires, est bien respectée et conforme aux normes mondiale. Le produit n'est pas libéré avant que sa qualité n'est été jugé satisfaisante.

Données bibliographiques

I-1-La vaccination**I-1-1- Définition du vaccin:**

Un vaccin est une préparation capable d'apporter à un sujet réceptif à une maladie donnée, une protection immunitaire vis-à-vis de cette maladie.

Les vaccins sont généralement dérivés d'agent infectieux pathogènes, que l'on modifie, pour les rendre inoffensifs tout en conservant leurs propriétés immunisantes, par atténuation (vaccins vivants atténués), inactivation (vaccins inactivés) ou fractionnement (vaccins sous unités).

Ils sont administrés le plus souvent par voie parentérale, les vaccins agissent en tant qu'antigène ; la résistance qu'ils confèrent est spécifique elle résulte d'une immunisation active contrairement à l'immunité passive qui fournit directement les anticorps (REY, 1980).

Le vaccin se compose d'un ou plusieurs principe actifs et d'excipients (MONTMEAS *et al* ., 2006), le principe actif est la substance responsable de l'action thérapeutique du vaccin, les excipients sont des composants nécessaires pour donner au vaccin une forme utilisable, assurer sa conservation et sa stabilité (GERACFAS, 2007).

I-1-2-Principe de la vaccination

C'est un moyen de prévention contre de nombreuses maladies infectieuses. La vaccination a pour but : d'établir chez un sujet non immunisé un état réfractaire comparable à celui que l'on trouve chez des sujets qui ont été l'objet d'une infection naturelle. cet état réfractaire est souvent lié à la présence d'anti corps protecteurs dans le sérum des sujets vaccinés ; il faut donc induire une réponse immunitaire qui prévient la prolifération de l'agent infectieux bactérien ou viral dans l'organisme. L'important est de promouvoir de façon préférentielle la réponse qui tend à prévenir la maladie, que cette réponse soit cellulaire (comme dans la tuberculose) ou humorale (comme dans le tétanos), (REGNAULT, 2002).

I -1-3- Types de vaccins

Les différents vaccins peuvent être classés : les vaccins préparés à partir d'organismes vivant ou atténués, les vaccins préparés à partir d'organismes morts ou inactivés, les vaccins anti toxiques et les vaccins synthétiques.

a) Vaccins issus d'agent infectieux inactivés

Les vaccins préparés à partir d'organismes morts ou inactivés sont composés de suspensions de bactéries ou de virus tués dont la virulence a été définitivement Supprimée (REGNAULT, 2002).

b) Vaccins antitoxiques

Certains pathogènes bactériens, parmi lesquels ceux qui sont à l'origine de la diphtérie et du tétanos, produisent des exotoxines ; ces dernières sont transformées en anatoxines après purification, détoxification par la chaleur et le formol, et ont par conséquent, perdu leurs pouvoirs toxiques mais ont conservés leur immunogénicité (REGNAULT, 2002 ; KUBY, 2001).

c) Vaccins issus d'agent vivant et atténués

Ce sont des souches virales atténuées ayant perdu toute ou une partie de leur virulence par passage sur cultures de cellules ou œufs embryonnes. Il s'agit en fait de mutants avirulents ou peu virulents du virus d'origine, qu'on a sélectionné à force de passages en série. Pour les souches bactériennes les passages se font sur milieux spécifiques.

Les souches obtenues sont alors incapables de développer entièrement la maladie qu'elles causaient auparavant mais conservent la propriété de se multiplié chez l'hôte naturel et donc d'y induire une réponse immunitaire de longue durée (GIRARD *et al.*, 1989). Ce genre de vaccin est généralement plus efficace dans les infections qui induisent principalement une réponse immunitaire à médiation cellulaire et son effet est plus durable que celui qui est composé d'agents infectieux inactivés (REGNAULT, 2002).

d) Vaccins synthétiques

Ces vaccins sont constitués des molécules de surface des agents infectieux afin d'obtenir des réponses immunitaires sans avoir à conserver inactiver et introduire le virus concerné (REGNAULT, 2002).

e) Vaccin à ADN

La vaccination par ADN est une nouvelle approche vaccinale pour induire une réponse immunitaire. Elle est basée sur l'introduction dans les tissus cellulaires par voie IM, par bombardement ou par voie nasale d'un plasmide purifié d'ADN contenant une séquence codant pour un antigène donné. Après administration de l'ADN, l'antigène est exprimé par les cellules transfectées induisant une réponse immunitaire spécifique et mesurable. L'efficacité des vaccins à ADN a été montrée sur de nombreux modèles animaux. Les trois types de réponse immunitaires ont pu être obtenus : la réponse cytotoxique impliquant les lymphocytes T cytotoxiques, la réponse T auxiliaire impliquant les lymphocytes Th avec une réponse forte de type Th1, la réponse humorale caractérisée par la production d'anticorps par les lymphocytes B généralement plus faible que celle induite par les vaccins traditionnels. Afin de renforcer la réponse immunitaire, différentes approches ont été étudiées comme la co-administration de cytokines, la Co-stimulation à partir de gènes spécifiques et l'adjonction de molécules de ciblage. Les travaux de recherche sur l'animal ont montré que la sécurité des vaccins à ADN était maîtrisée au niveau de l'intégration potentielle dans le génome de l'hôte, de la production d'anticorps anti-ADN et de l'induction possible d'une tolérance vis-à-vis de l'antigène exprimé. Les premiers essais cliniques de vaccins à ADN, déjà réalisés chez l'homme aux stades des phases I et II, couvrent les infections par le VIH, les hépatites B et C, les infections à herpès virus, la tuberculose, la malaria. Des essais sont aussi en cours en cancérologie et dans le traitement des allergies. La nouvelle approche de vaccination par des vaccins à ADN supporte des espoirs importants du fait du faible coût de fabrication des vaccins et de leur stabilité à température ambiante (PRUGNAUD, 2003).

Le tableau ci après montre les différents types de vaccins contre les infections bactériennes et virales :

Tableaul : types de vaccins

Composition des vaccins	Maladies infectieuses évitées	
	Infections bactériennes	infections virales
Organismes vivants atténués	Tuberculose(BCG) Typhoïde Choléra	Oreillons Rougeole Poliomyélite
Inactivés entiers	Coqueluche	Rage
Anatoxines	Tétanos Diphtérie	
Vaccins synthétiques	Coqueluche (vaccin acellulaire)	Grippe

(REGNAULT, 2002).

I-2- Les bases immunologiques de la vaccination

Les vaccins Antidiphtériques, Antitétaniques, et Anticoquelucheux sont toujours administrés en association dans le cadre du PEV ; ce programme qui a été développé pour lutter contre les maladies infectieuses qui constituent les principales causes de mortalités infantiles.

Les vaccins induisent pour l'individu vacciné la production d'anticorps (Ac) protecteurs, d'où l'immunité envers le tétanos, la diphtérie et la coqueluche. Les anatoxines jouent un rôle important car la protection contre ces maladies dépend de leur capacité à neutraliser leurs toxines.

La réponse immunitaire au vaccin DTcoq se fait par l'intermédiaire d'un premier contact avec l'antigène (Ag) dit primaire induit la transformation des lymphocytes en lymphocytes mémoires, lorsqu'il y'a un deuxième contact (rappel) une réponse secondaire interviendra d'où réactivation des lymphocytes mémoires qui va donner une réponse plus rapide.

L'introduction de la bactérie ou l'extrait induit soit une immunité à médiation humorale d'où production d'Ac spécifique par les lymphocytes B de type IGg à la qu'elle appartient les anatoxines tétanique et diphtérique d'ou la destruction de la bactérie et/ou toxine. Soit une immunité à médiation cellulaire donc y'aura production des lymphocytes T auxiliaire et T cytotoxique d'où la production des cytokines qui détruit la cellule infectée. (Belouni, 2009).

I-3- Le vaccin DT coq

Le vaccin diphtérique, tétanique et coquelucheux adsorbé est un vaccin associé c'est une préparation d'anatoxine diphtérique et tétanique et de bactéries entières inactivées de *Brdetella pertusise* adsorbées sur un support minéral. La préparation est inactivée par action du formaldéhyde (Pharmacopée Européenne, 2002 ; BACKER, 2008).

I-4- Le conservateur : thiomersal

Le Thiomersal, est un composé chimique organo-mercuriel de formule $C_9 H_9 Hg Na O_2 S$, composé approximativement de 49% de mercure (en masse).

Le thiomersal est utilisé comme antibactérien ,c'est un agent conservateur de certains médicaments (préparation d'immunoglobulines, produits de soins ophtalmique ou nasal),tests de diagnostic d'allergies, anti venins, et vaccins pour permettre leur conservation lors de l'administration du produit afin d'éviter le développement de micro-organismes. Il a notamment été utilisé pour les vaccins multi dose injectables afin de prévenir des effets sérieux tels qu'une contamination par *Staphylococcus aureus* (qui a infecté en 1928 :12 enfants sur 21 suite à l'inoculation d'un vaccin anti-diphtérie ne contenant pas de conservateur). Contrairement à d'autres conservateurs de vaccins utilisés à l'époque, le thiomersal ne réduit pas l'efficacité des vaccins, il contient l'éthyle mercure qui ne s'accumule pas au niveau de l'organisme car il est éliminé donc il n'est pas toxique. (BACKER ,2008).

I-5- La notion de qualité

I-5-1- L'assurance de la qualité

«L'assurance qualité est l'ensemble des actions préétablies, systématique nécessaire pour donner la confiance approprié à un produit ou service pour satisfaire les exigences de qualité, elle présente ainsi l'ensemble des mesures prises pour s'assurer que les médicaments

fabriqués sont de la qualité requise pour l'usage auquel ils sont destinés (AIACHE et al., 2001).

I-5-1- 1- Les bonnes pratiques de fabrication (BPF)

L'OMS les définit comme étant : « un des éléments de l'assurance de la qualité, elles garantissent que les produits sont fabriqués et contrôlés de façon cohérente et selon les normes de qualité adaptées à leur emploi et requises par l'autorisation de mise sur le marché» (WEHRLE, 2007).

Le principal objectif des bonnes pratiques de fabrication est donc de reproduire la qualité du produit telle qu'elle est décrite dans le dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM), (Le HIR, 2001 ; COZ, 2003).

I-5-2 La définition de la qualité

Selon les normes ISO (International Organization of Standardization). La qualité est :
« L'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins explicites ou implicites» (HIR, 2001).

La qualité est l'aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences, donc une aptitude à rendre le service attendu, une aptitude à l'usage, tout à fait adapté à notre produit, le médicament, et ces divers critères de qualité.

L'objectif final de la qualité globale de l'ensemble des actions qualité réunit :

- La qualité sociale, technique, technologique
- La qualité financière (maitrise des couts)
- La qualité temporelle (maitrise des délais)

Elle peut conduire au management intégré (qualité, environnement, hygiène et sécurité) ; la qualité globale est parfois appelée à tort «qualité totale» (WEHRLE, 2007).

I-5-3- Le contrôle de la qualité

Le contrôle de qualité selon (Le HIR ,2001 ; SMANS et al ., 1997) :

« Activité telle que mesurer, examiner, essayer ou passer au crible une ou plusieurs caractéristiques d'une entité et à comparer les résultats aux exigences spécifiées en vue de déterminer si la conformité est obtenue pour chacune des caractéristiques à des spécifications préétablies». Il s'ensuit un tri entre entité conforme et non conforme.

Le contrôle de qualité constitue donc un procédé qui permet de déceler les différents types d'erreurs qui existent lors des déterminations d'analyse quantitatives effectués dans un laboratoire..

I-5-4- Le contrôle de la qualité des vaccins

La qualité d'un vaccin, provient de l'ensemble des maillons qui constituent sa chaîne de fabrication. Cette qualité est déterminée par le contrôle des matières premières, l'environnement de fabrication, les équipements et les connaissances techniques, les méthodes introduites dans sa conception, le conditionnement, le stockage et le transport.

A chaque étape de sa conception le vaccin va subir des contrôles strictes, afin d'établir sa conformité, ou non-conformité en fonction des normes internationales (SAMANS, 1997).

Le contrôle de la qualité concerne, l'échantillonnage, l'établissement des spécifications l'analyse, ainsi que l'organisation, l'établissement des documents et des procédures de libération qui garantissent que les essais nécessaires ont bien été effectués et que les produits finis ne sont pas vendus ou distribués avant que leur qualité n'ait été jugée satisfaisante (Le HIR, 2001).

Matériel et Méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de contrôle de qualité de l'Institut Pasteur d'Alger sur une durée de quatre mois. Elle porte sur le contrôle de la qualité du vaccin DT coq multi dose importé, pour cela nous avons réalisé plusieurs contrôles.

II-1- Matériel

a) Matériel biologique

Notre modèle d'étude est représenté par le vaccin DT COQ qui a pour rôle de lutter contre la mortalité infantile, et donc il est important de contrôler sa qualité avant son utilisation par différents tests :

1-Physico-chimiques:(Aspect, pH, NaCl, thiomersal, aluminium)

2- Immunologique (test d'identité) dans le quel nous avons utilisé le sérum anti diphtérique et le sérum anti tétanique

3-Tests toxicologiques pour ce contrôle nous avons pris 12 souris de souches Oncins France, souche 1 (OF1) dont le poids varie entre 17et 22g et 3 cobayes de Souches Harthly Albinos dont le poids varie entre 250et350g pour chaque lot de vaccins pour la toxicité anormale, cependant nous avons utilisé pour la toxicité spécifique 10 souris à vaccinées ainsi 10 souris témoins de même souche que la toxicité anormale mais dont le poids varie entre 14et16g aussi pour chaque lot de vaccins(Pharmacopée Européenne,2005).

4- Microbiologiques (test de stérilité) pour s'assurer de la sécurité de notre vaccin.

b) Matériel non biologique : (annexe 1).

II-2-Echantillonnage

Notre échantillonnage est réalisé de manière aléatoire pour cela nous avons pris trois lots de vaccin DTcoq de l'échantillothèque à +4°C ; ces produits sont identifiés par les références :(Nom du produit, nom du laboratoire fabricant, le numéro d'ordre, le numéro de lot et les dates de fabrication et de péremption).

Un bon résultat dépend d'un plan d'échantillonnage adéquat, nous avons utilisé pour notre travail 3 lots de vaccins DTcoq d'un producteur externe voir le tableau ci-dessous :

Tableau : lots de vaccins utilisés pour le contrôle

Designation	numéros des Lots	Producteur	Date de péremption
Vaccin DTcoq	1	Sanofi Pasteur	Avril 2011
Vaccin DTcoq	2	Sanofi Pasteur	Avril 2011
Vaccin DTcoq	3	Sanofi Pasteur	Mars 2012

II-3-Composition du vaccin DTcoq

Le vaccin DTcoq se représente sous forme de flacons multi dose.



Figure 1 : Présentation des flacons du vaccin DTcoq des trois lots (Originale).

II-4-Méthodes

Les différentes méthodes de contrôle appliquées sur ces lots de vaccins visent à vérifier et confirmer que les normes exigées par l'OMS et la Pharmacopée Européenne ont bien été respectées ainsi qu'elles répondent aux directives et aux règlements imposés par la réglementation nationale en vigueur, seuls les lots qui sont satisfaisants à tous les tests peuvent être libérés.

II-4-1- Contrôle physico-chimique

Cette partie est consacrée à l'ensemble des méthodes d'analyse physico-chimique, elles sont caractérisées par leur simplicité et leur rapidité de mise en œuvre.

Le contrôle physico-chimique a pour but de garantir au produit sa stabilité et sa consistance en contrôlant non seulement des phénomènes physiques : viscosité, point de fusion, indice de réfraction, densité, osmolalité, pH, mais aussi des phénomènes chimiques : Aspect, dosage des ions, métaux lourds, conservateurs (PRADEAU, 1992).

II-4-1-1-L'étude de l'aspect

L'étude de l'aspect de notre vaccin DT coq consiste à vérifier son aspect initial (repos) et après mélange des flacons.

Principe

L'étude de l'aspect permet d'apprécier la pureté générale d'une substance mise en solution et détecter la présence d'impuretés insolubles ou colorées dans le solvant choisis (PRADEAU, 1992).

Mode opératoire

La méthode du test de l'aspect est une méthode visuelle qui se réalise sur le contenu des flacons de vaccins des trois lots, d'après la méthode décrite dans la Pharmacopée Européenne, 2005.

Après avoir mélangé le contenu des flacons de vaccins des trois lots on obtient une suspension opalescente homogène de couleur blanchâtre qu'on laisse reposer sur une paillasse pendant une durée de 30 minutes, on obtient à la fin non seulement un dépôt de couleur blanchâtre (phase qu'on appelle dépôt adjuvant qui contient l'anatoxine tétanique et l'anatoxine diphtérique et la coqueluche), mais aussi une solution liquide limpide (phase liquide). Il est à noter que s'il n'y a pas un bon dépôt, notre vaccin ne sera pas de bonne qualité.

II-4-1-2 La mesure du pH

Le pH est un nombre qui représente la concentration en ions hydrogènes $[H^+]$ d'une solution aqueuse pour des raisons pratiques sa définition est expérimentale; il exprime l'acidité ou l'alcalinité d'un milieu (Pharmacopée Européenne, 1997).

Par définition le pH « potentiel Hydrogène » est une mesure de la concentration en ions H_3O^+ (ions hydroniums) d'une solution on écrit : $pH = -\log [H_3O^+]$ (SALGAROLO, 2003).

Principe

La détermination de la quantité des ions hydronium (H_3O^+) dans une solution ou la mesure de pH est effectuée à l'aide d'un pH mètre (annexe 2), une électrode combinée est plongée dans une solution et l'appareil correctement calibré donne directement la valeur du pH (Pharmacopée Européenne, 2005).

Mode opératoire

La méthode d'étude du pH est une méthode effectuée sur le contenu des flacons de vaccins des trois lots (SALGAROLO, 2003 ; Pharmacopée Européenne, 2005).

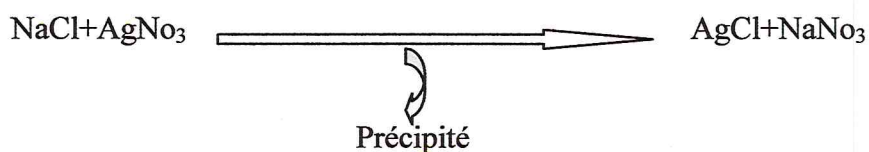
- Le pH mètre doit être étalonné avant chaque utilisation, on plonge l'électrode dans une solution tampon de pH connue (solution neutre pH=7, solution acide pH=4) ;
- On mesure la température du milieu à analyser avec un thermomètre ;
- On rince l'électrode soigneusement à l'eau distillée.
- On verse notre échantillon (vaccin DTcoq) dans un bécher propre et on plonge l'électrode à l'intérieur de manière qu'il baigne bien dans la solution ;
- On attend la stabilité de l'affichage de l'appareil à ce moment on note la valeur du pH affichée sur le cadran du pH mètre.

II-4-1-3- Le dosage du NaCl par la méthode de MOHR

Le dosage est réalisé par une méthode titrimétrique (Méthode de MOHR) (SKOOG et al., 2002).

Principe

Le principe est basé sur le titrage d'une solution de chlorure (Cl^-) par une solution de Nitrate d'Argent $AgNO_3$ en présence d'un indicateur K_2CrO_4 Selon la réaction suivante :



Mode opératoire

Le dosage de NaCl est effectué sur le vaccin DTcoq appartenant aux trois différents lots selon la Pharmacopée Européenne : nous avons réalisé ce test par double essai en prenant deux erlenmeyers :

- On introduit dans chacun : 0,5ml du vaccin DTcoq on rajoute quelques gouttes de chromate de potassium (K_2CrO_4) ;
- On titre avec une solution d'AgNO₃ à une normalité de 0,0103N jusqu'au virage de la couleur vers le Jaune Marron ;
- On détermine le volume de la chute de la burette en AgNO₃.

Pour le calcul du taux de chlorure de sodium nous avons utilisé la formule suivante :

$$T_{NaCl} = (M \times V \times 0,0103) \div PE$$



Figure2: Titrage des chlorures (Originale).

Ou :

T_{NaCl} : taux de chlorure de sodium en mg/l.

M : masse molaire de NaCl.

V : volume d'AgNO₃.

PE : prise d'essai du vaccin.

II-4-1-4- Le dosage de l'Aluminium

L'aluminium est le troisième élément de l'écorce terrestre et l'élément métallique le plus abondant, il est présent dans tous les milieux environnementaux sous forme de sels et d'oxydes (GOURIER et FRERY, 2004). Les sels d'aluminium jouent le rôle d'adjuvants dans les vaccins d'où ils ont un effet de dépôts puisqu'ils produisent de petits granulomes au sein des quels l'antigène est retenue (ROITT et al., 2002).

Principe

Pour la mesure du taux d'aluminium dans le vaccin DT COQ on utilise une méthode complexométrique ou le sel di sodique de l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) réagit avec l'ion Al^{+3} en présence de tampon d'acétate et un indicateur coloré pyridyl azonaphtol (**indicateur orange**) la présence d'aluminium est indiquée par une coloration violette (BELCHERA et al., 1999).

Remarque : les préparations des différentes solutions pour le dosage de l'aluminium sont mentionnées dans Annexe 4.

Mode opératoire

Selon la Pharmacopée Européenne 2005, le dosage de l'aluminium réalisé sur un essai témoin (eau physiologique) et le vaccin DTcoq selon le mode opératoire suivant :

On prend deux matras : l'une pour l'échantillon (2ml vaccin DTcoq) et l'autre pour le témoin (2ml eau physiologique) aux quels on ajoute :

- 2ml de vaccin ~~auquel~~
- 1ml de H_2SO_4 et 6 gouttes de HNO_3 ;

On chauffe jusqu'à apparition de vapeur blanchâtre épaisse, ensuite on procède à un refroidissement pendant quelques minutes ensuite on rajoute ;

- 10ml d'eau distillé avec précaution ;

Si la solution est trouble porter à ébullition jusqu'à obtention d'une solution limpide et on rajoute ;

- 0,05ml de méthyle orange

Puis on neutralise avec NaOH (6,5 à 7ml) jusqu'à l'obtention d'une couleur jaune ;



Figure 3: Neutralisation d' Al^{+3} par NaOH D'où la coloration rose jaune (Originale).

- Retitrer avec H_2SO_4 (2N) pour dissoudre tout précipité qui pourrait se former jusqu'à l'obtention d'une couleur rose ;

On transfère le contenu des matrasses dans l'Érlenmeyer de 250ml on rajoute;

- L'eau (H_2O) de lavage

- Additionner 10ml d'Éthylène Diamine Tétracétique Acide (EDTA) à 0,02M

- 10ml de tampon d'acétate (réaction de complexation);

On fait bouillir doucement pendant 3min et on rajoute;

- 1ml de pyridyl azo-naphtol comme indicateur ;

On titre chaque solution avec $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ à 0,02M jusqu'à virage de la couleur de la solution de l'orange vers le violet.



Figure 4: Après titrage et l'ajout de Pyridyl Azo naphthol (Originale).

Remarque : Il faut savoir que :

V_T : volume de la chute de la burette est de 8,5ml

1ml d'EDTA de Na à 0,02M correspondant à 0,5396mg d'Al.

Nous avons utilisé pour le calcul de la teneur de l'Aluminium la formule suivante

Teneur de l'Aluminium =

(Titre témoin + Volume de l'échantillon) x 0.5396

(Volume de l'échantillon PE=2) x 0.5

Où :

Teneur de l'Aluminium: exprimer en mg/dose.

Volume de l'échantillon : c'est la PE = 2ml. (PE : prise d'essai).

Volume de titre témoin : est de 8,5ml.

Volume du titre de l'échantillon : est celui mesuré après le titrage.

Norme $\leq 1,25$ mg/dose.

H-4-1-5- Le dosage du thiomersal

Le thiomersal constitue le conservateur des vaccins surtout pour les multi dose.

a) Principe

La détermination de la concentration du thiomersal dans le vaccin DTcoq est réalisée par la méthode spectrophotométrique en utilisant la Dithizone (dilué dans le chloroforme en donnant une coloration verte). qui est utilisé dans l'extraction pour la séparation des deux phases (Pharmacopée Européenne, 2005).

b) Mode opératoire

Réactifs : La préparation des réactifs pour le dosage du thiomersal est donnée dans l'annexe4.

- à partir d'une solution mère de thiomersal à 0,01% : on prépare une gamme d'étalonnage pour les concentrations suivantes (0,02-0,05-0,07-0,09) ml, ces concentrations sont complété à 10ml du tampon d'acétate à 1% (pH =6) puis on ajoute ;



Figure 5 : Préparation de la gamme d'étalonnage(Originale).

- 10ml d'une dilution de Dithizone à 0,01% dans du chloroforme ; la Dithizone est miscible dans le chloroforme et non dans l'eau ;

Parallèlement, on prépare notre échantillon (0,5ml vaccin DT COQ) en double essai (en double ampoules en verre) qu'on complète avec 10ml du tampon acétate ;

- Les différentes ampoules (échantillon et gamme étalon) sont agité pendant 45secondes (annexe3) ;

On prélève de chaque ampoule une quantité suffisante de la phase supérieur qu'on introduit directement dans les cuves du spectrophotomètre afin de lire les densité optiques (DO)

correspondantes aux concentrations précédentes sur le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 485nm (annexe 2 et 3) ;

Les différentes étapes de la gamme d'étalonnage sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau III : Tableau récapitulatif du dosage du thiomersal

Ampoules	1	2	3	4	5	6
Prise d'essai(PE) du vaccin (ml)	0,5	0,5	–	–	–	–
Concentration en thiomersal de la gamme d'étalonnage (ml)	–	–	0,2	0,5	0,7	0,9
Tampon d'acétate d'ammonium (ml)	9,5	9,5	9,8	9,5	9,3	9,1
Dithizone (ml)	10	10	10	10	10	10
Volume final (ml)	20	20	20	20	20	20

(BACKER, 2008)

c) Expression des résultats

On détermine les différents facteurs F (gamme étalon et échantillons) à partir de la courbe d'étalonnage $DO=f(C)$

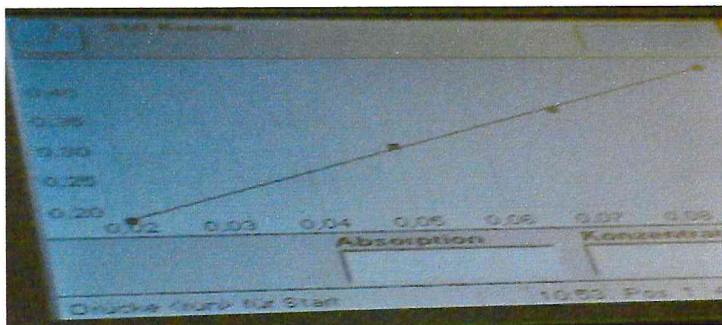


Figure 6 : Courbe d'étalonnage du thiomersal ($DO=F[C]$)

Suivant la formule :

$$F = [C] / DO$$

Ou :

F: Facteur.

[C] : Concentration de la gamme étalon.

DO : Densité optique.

On calcule le facteur global R par la moyenne des F obtenus pour chaque concentration, puis on l'utilise pour déduire la concentration du thiomersal du vaccin DTcoq par la formule suivante :

$$C = R \times DO$$

C : Concentration en thiomersal dans l'échantillon.

R : Facteur global.

DO : Densité optique de l'échantillon.

II-4-2 Contrôle Immunologique (test d'identité)

Cette procédure décrit la méthode d'identification des principes actifs du vaccin DTcoq par deux méthodes immunologiques:

- Agglutination pour identifier la valence coqueluche (les bactéries de *Bordetella pertussis* sont présentes dans le culot du vaccin après la réalisation du mode opératoire).
- Double diffusion en gel d'agarose pour identifier les valences diphtérique et tétanique présentes dans le surnageant du vaccin. (Pharmacopée Européenne, 2005).

Principe de la méthode d'agglutination

On détermine la valence **coqueluche** par la **méthode d'agglutination** qui met en présence des Ag et un antisérum contenant des Ac spécifiques (anti agglutinogènes 1,2 et 3). (CHASSTELLAN et PAUL, 1994). Le composant coquelucheux est identifié à l'aide des immuno-sérums spécifiques de *Bordetella pertussis*, après remise en suspension à partir du culot de centrifugation. (Pharmacopée Européenne, 2002). Nous n'avons pas réalisés cette technique par manque de sérum.

Principe de la méthode de double diffusion en gel

La méthode est basée sur la diffusion d'anticorps et d'antigène à une concentration définie chaque entité est déposée dans un puits creusé dans un gel d'agarose, la distance entre les deux puits étant de 5à7mm. Au point d'équivalence se formera un Arc de précipitation révélant l'identité de l'Ag (l'Arc apparait après coloration). (Pharmacopée Européenne, 2005).

Mode opératoire

La méthode d'immuno- diffusion du test d'identité réalisé sur le vaccin DTcoq est décrite dans la Pharmacopée Européenne (2005) :

- On prend trois tubes coniques dans lesquels on verse le contenu des trois lots de flacons de vaccins DTcoq respectivement puis on centrifuge 4000tours/ 30min (annexe2) ;
- On élimine le surnageant et on garde le culot auquel on ajoute 3ml du citrate tri sodique et on laisse pendant 24h au bain marie (37 °C) sous agitation ;

Après l'incubation des tubes on complète avec de l'eau distillé à 10ml puis on recentrifuge (4000tours /30min) ; et cette fois ci on récupère le surnageant qui contient les Ag (anatoxines).

- **Préparation des lames** : on prend deux lames pour chaque lot : une pour déterminer l'anatoxine diphtérique et l'autre pour déterminer l'anatoxine tétanique, après on coule la gélose sur les lames on laisse refroidir à +4 °C pendant 10mn.

- **Préparation des puits** : à l'aide d'un emporte pièce creuser les puits destinés aux antigènes et aux anticorps, la distance entre les puits doit être de 5à7mm. Conserver les lames à +4 °C si elles ne sont pas utilisées sur le moment.



Figure7: Préparation des puits dans le gel d'Agarose(Originale).

Le sérum de référence est dilué au $1/1000^{\text{ème}}$ à partir de cette dernière on prend $10\mu\text{l}$ qu'on introduit dans le puit central de la lame pour les deux autres puits extérieurs on introduit $10\mu\text{l}$ de l'Ag (vaccin DTcoq). Par la suite les lames sont incubés dans une boîte humide pendant 48h à 5 jours ;



Figure8: Introduction de $10\mu\text{l}$ de la dernière dilution dans le puit (Originale).

- Après l'incubation, les lames sont lavés dans trois bains successifs d'eau physiologiques et restent 24h dans le $3^{\text{ème}}$ bain ;
- Après 24h, les lames seront enlevées on les introduits dans l'eau distillée pendant 1 heure, ensuite elles seront séché à l'étuve ;

Coloration : Une fois les lames séchés elles sont colorées par le bleu de comassie (5mn) jusqu'à formation des Arc de précipitation entre l'Ac du sérum de référence (tétanique ou diphtérique) et l'Ag de l'anatoxine (tétanique ou diphtérique) ;

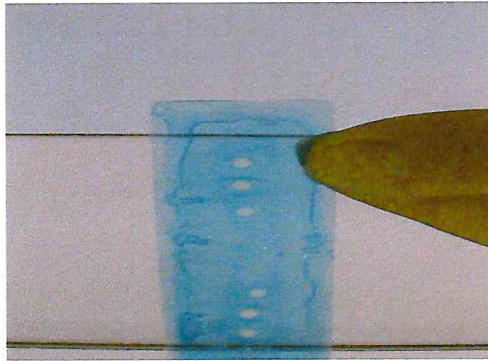


Figure 9 : Formation des Arc de précipitation après coloration

Décoloration : les lames sont décolorées en bains successifs de solution de décoloration(Annexe5) jusqu'à décoloration complète du gel à l'exception des arcs de précipitation éventuels.

Réactifs : les réactifs utilisés dans le test d'identité et la préparation des dilutions sont mentionnés dans l'annexe 5.

Remarque

- La présence d'un arc de précipitation entre Ac et les Ag se traduit par la présence d'identité et donc le résultat est positif.
- L'absence d'un arc de précipitation entre Ac et les Ag se traduit par l'absence d'identité et donc le résultat est négatif.

11-4-3- Contrôle microbiologique (test de stérilité)

L'essai de stérilité est réalisé dans des conditions aseptiques pour éviter tout risque de contamination accidentelle du produit durant l'essai. Deux méthodes pour le test de stérilité :

- 1- Méthode directe sur flacons.
- 2- Méthode indirecte sur steritest (annexe2).

Principe

L'essai de stérilité consiste à rechercher la présence éventuelle de micro-organismes en présence de conditions de culture favorable, dans un produit ou préparation qui doivent être stériles. Un résultat conforme signifie qu'aucun micro-organisme contaminant n'a pu être

décelé dans l'échantillon examiné dans les conditions de l'essai. (HIR, 2001 ; Pharmacopée Européenne ,2006).

Remarque

La composition des milieux de culture utilisés dans le test de stérilité sont mentionnés dans l'annexe 5.

Mode opératoire

Pour les deux méthodes de stérilité il faut :

- Une salle nettoyée, décontaminée et stérilisée aux rayons UV ;
- Une hotte à flux laminaires dont les surfaces ont été nettoyées avant chaque manipulation ;
- Utilisation de membranes dont le diamètre du pore est de 45µm ;
- Les deux milieux de cultures utilisés sont:
 - Tryptone soja bouillon(TSB), (pour la recherche des champignons).
 - Thioglycolate (TG), (pour la recherche des germes aérobies et anaérobies).
- L'incubation pour les 2 méthodes est de 14 jours.

1-Méthode d'ensemencement direct

On prend trois pools d'échantillon (vaccin DTcoq) respectifs des trois lots de vaccin testés (voir schéma) à partir desquels, on prélève :

- 10ml échantillon 1(vaccin DTcoq)+100ml Thioglycolate (TG)
- 10ml échantillon 1(vaccin DTcoq) +100ml Tryptone soja bouillon(TSB)
- 10ml échantillon 2(vaccin DTcoq)+100ml Thioglycolate (TG)
- 10ml échantillon 2(vaccin DTcoq) +100ml Tryptone soja bouillon(TSB)
- 10ml échantillon 3(vaccin DTcoq)+100ml Thioglycolate (TG)
- 10ml échantillon 3(vaccin DTcoq) +100ml Tryptone soja bouillon(TSB)

Par la suite les trois flacons d'échantillon avec TSB sont incubés à l'étuve à 25°C, et celle du TG sont incubés à 37.

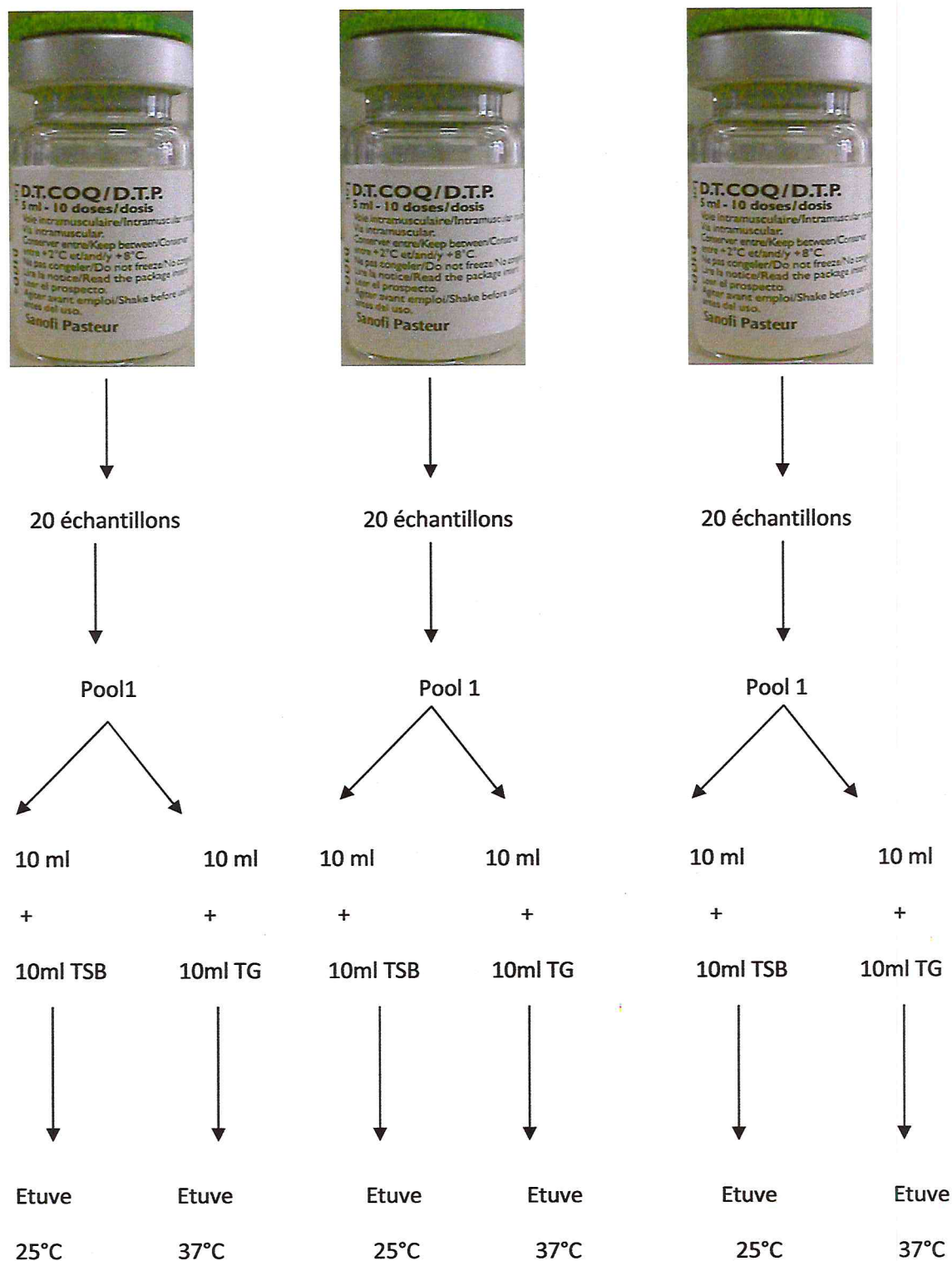


Figure 10 : Schéma présentatif de la méthode d'ensemencement direct sur flacons

2- Méthode de filtration sur Membrane

Cette méthode est réalisée dans un stérilisateur dans lequel on place un dispositif de filtration muni d'une membrane (figure 10), dans ce dernier on introduit 100ml de diluant (figure 11) stérile et approprié (dont le but humidifier la membrane et éliminer les conservateurs) ;

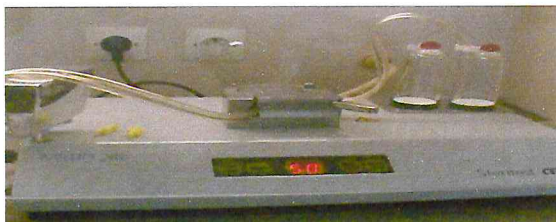


Figure 11 : Le dispositif de filtration sur le stérilisateur

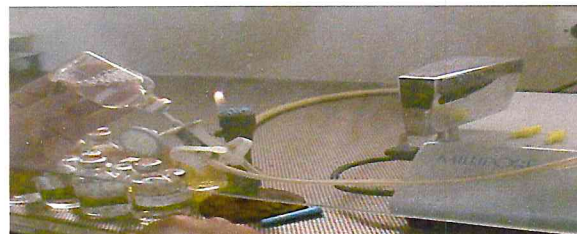


Figure 12 : L'introduction de 100ml du diluant

Le dispositif de filtration est muni d'une pompe péristaltique qui sert à percer les bouchons des flacons de l'échantillon (vaccin DTcoq) et aspirer le contenu de ce dernier, une fois introduit à l'intérieur il est filtré par la membrane des centistères (figure 12) ;



Figure 13 : Introduction du vaccin (Originale).

à l'aide de bouchons spécifiques on ferme les canistères, par la suite les deux milieux de cultures (TSB et TG) sont introduits à leur tour séparément dans le dispositif à travers les tubulures, à la fin on récupère :

- Le TSB dans le premier canistère
- Le TG dans le deuxième canistère

Puis on coupe les tubulures qui vont servir à fermer les canistères, ces derniers sont mis à l'étuve pour une durée de 14 jours (figure 13).



Figure 14: La coupe des tubules et leur fixation sur les canistères (Originale).

Après incubation on examine les milieux pour déceler la présence ou l'absence de signes macroscopiques d'une prolifération microbienne :

- Si y' a aucun trouble a été constaté dans les deux milieux, donc le produit à examiner satisfait l'essai de stérilité.

- Si une turbidité a été constatée dans l'un des milieux donc le produit à examiner ne satisfait pas au test, alors il faut passer à l'identification du germe contaminant et répéter l'essai.

- Si le germe identifié la deuxième fois est différent à celui identifié la première fois donc la contamination est due aux conditions de travail :(manipulateur, matériel non stérile, mal manipulation...).D'ou on procède à une première répétition.

- **Première répétition**

- Si aucune manifestation de prolifération microbienne n'est décelée, le produit satisfait à l'essai de stérilité.

- Si les contaminants ne peuvent pas être facilement différenciés, le produit ne satisfait pas à l'essai.

- Si les contaminants sont facilement différenciés, une seconde répétition de l'essai peut être effectuée.

- **Deuxième répétition de l'essai**

- Si aucune manifestation n'est décelée, le produit satisfait à l'essai de stérilité.

- Si une prolifération est détectée, donc le produit ne satisfait pas à l'essai.

II-4-4- Contrôle toxicologique

La toxicité est un test de sécurité des produits biologiques injectables, elle est appliquée à des animaux de laboratoire aux quels on injecte le produit fini. Après une période d'observation on évalue la tolérance du produit injecté elle peut être une toxicité anormale effectuée sur des souris et des cobayes ou bien spécifique effectuée uniquement sur les souris. (Pharmacopée Européenne, 2005).

II-4-4-1- Test de toxicité anormale**Principe**

La toxicité anormale met en évidence la toxicité des excipients du vaccin, l'injection intra péritonéale des animaux permet un maximum d'absorption de la préparation au niveau de l'intestin grêle et par voie de conséquence permet de transférer à l'animal une quantité maximale de toute substance toxique présente dans la préparation. Pour que le vaccin DTCCOQ soit satisfaisant, les animaux doivent survivre sans présenter aucun symptôme particulier. (Pharmacopée Européenne, 2005).

Mode opératoire

La méthode du test est une méthode biologique effectuée sur des animaux (souris et cobayes), dans la méthode décrite dans la Pharmacopée Européenne ,2008.

a)Préparation des souris et cobayes

On pèse séparément et individuellement l'ensemble des animaux avant le test (J_0 c'est le poids à l'inoculation) ou le poids des souris est de (17g à 22g) et celui des cobayes est de (250g à 350g) en les marquant par des colorants sur la tête ou sur la queue ou sur les deux pour pouvoir les différencier :

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 6	Témoin incolore
Cobayes 1	Tête rouge(TR)
Cobaye 2	Queue rouge(QR)
Cobaye 3	Témoin (incolore)

b) Injection

Injecter par voie intra péritonéale à chacune des 5 souris une dose humaine de préparation sans dépasser 0.25ml, et 0.5ml pour les cobayes, ou nous avons effectués deux essais d'injection sur les souris et un essai sur les cobayes.

Remarque

Durant le test les souris et les cobayes sont mis dans des cages convenables, et reçoivent une alimentation adéquate et de l'eau. Une température ambiante (18 °C à 22 °C) maintenue durant la durée du test.

a) Observation

Les animaux (souris, cobayes) sont observés après l'injection durant 7 jours pour détecter s'il y a eu des mortalités éventuelle ou des symptômes de maladies pour cela il faut:

- Effectuer une pesée individuelle des animaux 3 jours après l'inoculation;
- Refaire les pesés au 7^{ème} jours, à la fin de la période d'observation le poids des animaux ne doit pas être inférieur à celui du poids initial.

II-4-4-2- Test de toxicité spécifique**Principe**

La toxicité spécifique est une méthode biologique, elle met en évidence la toxicité due au principe actif. Cette procédure décrit le gain de poids des souris pour la valence coqueluche dans les vaccins adsorbés. Ce test de gain de poids des souris est applicable aux vaccins contenant la valence coqueluche (**Pharmacopée Européenne ,2005**).

Mode opératoire

La méthode du test est effectuée sur animaux (souris), dans la méthode décrite dans la Pharmacopée Européenne ,2005.

a)Préparation des souris

Peser individuellement l'ensemble des souris avant le test (j_0), le poids doit être entre 14et16g (j_0 c'est le poids à l'inoculation), utiliser au moins 10souris en bonne santé pour le vaccin et 10souris témoin. Les souris doivent être du même sexe (male ou femelle) répartis de façon égale entre les groupes. Elles doivent avoir accès à la nourriture et à l'eau pendant 24h au moins avant l'injection, durant l'essai il faut que la pesée des souris soit régulière durant 7 jours.

b) Injection

Prendre 5ml du vaccin dilué dans 5ml d'eau physiologique, puis injecté par voie intra péritonéale à chacune des 10 souris du groupe à vacciner une dose de 0,5ml ; pour les 10 souris témoins : introduire 5mg de thiomersal dans 50ml d'une solution de NaCl à 9g/l, puis injecté par voie intra péritonéale 0,5ml d'une solution de NaCl 0,01% de thiomersal pour chaque souris du groupe témoin.

c) Observation

L'observation des souris témoins et vaccinée s'effectuent durant 7jours :

- Peser l'ensemble des souris vaccinés et témoins les trois premiers jours après l'inoculation ;

- Peser l'ensemble des souris vaccinés et les souris témoins à la fin de la période d'observation de 7jours.

e) Interprétation et critères d'acceptation :

•Après 72h, la masse totale du groupe de souris vaccinées ne doit pas être inférieure à ce qu'elle était avant l'injection.

• Après 7jours le gain pondérale moyen par souris vaccinées n'est pas inférieur à 60% de celui des souris témoin.

•Le pourcentage de la mort des souris vaccinées et témoin ne doit pas excéder 5% du nombre totale durant l'essai (**Pharmacopée Européenne 2005**).

Résultats et Discussion

L'objectif de ce travail est de s'assurer de la conformité du vaccin DTcoq selon les normes exigées par la pharmacopée européenne et l'OMS, pour cela nous avons réalisés plusieurs contrôles :

- Contrôle physico-chimique : pour s'assurer de la stabilité du vaccin DTcoq ;
- Contrôle immunologique (test d'identité) : pour identifier le principe actif du vaccin ;
- Contrôle microbiologique (test de stérilité) : pour s'assurer de la stérilité et la sécurité du vaccin ;
- Contrôle toxicologique : pour s'assurer que le vaccin DTcoq n'a pas un effet toxique pour la santé humaine.

Dans cette partie nous avons présenté les résultats des différents contrôles réalisés respectivement sous forme de tableaux interprétés et discuté à la lumière de la bibliographie.

III-1-Résultats du contrôle physico-chimique

Les résultats des dosages physico-chimiques concernant : l'aspect du vaccin, la mesure du pH, le dosage de NaCl, le dosage de l'aluminium et le dosage du thiomersal pour les trois lots de vaccin DTcoq sont portés dans le tableau suivant :

Tableau IV : Résultats des paramètres physico-chimiques.

Lots/ Test	Aspect du vaccin après mélange	Mesure du pH	Dosage du Chlorure de Sodium mg/ml	Dosage de l'aluminium mg/dose	dosage du thiomersal mg/dose
1	Suspension opalescente et blanchâtre	6,9	9,2248mg/ml	0,6407mg/dose	0,0410 mg/dose
2	Suspension opalescente et blanchâtre	6,5	8,7252mg/ml	0,6677mg/dose	0,0425 mg/dose
3	Suspension opalescente et blanchâtre	7,00	8,8533mg/ml	0,6879mg/dose	0,03705 mg/dose
Normes Pharmacopée Européenne	Suspension opalescente avec absence de trouble	pH (6-7)	8,50- 9,50 mg/ml	T Aluminium ≤ 1,25 mg/dose	C _{thiomersal} ≤ 0,05 mg/dose

D'après les données du tableau IV ; l'appréciation de l'aspect du vaccin pour les trois lots est identique après avoirs mélanger le contenu du vaccin à savoir une suspension opalescente et blanchâtre avec absence de trouble, on peut donc déduire qu'il y'a eu un bon dépôt ; selon **PRADEAU(1992)** : la détermination de l'aspect permet d'apprécier la présence d'impuretés colorés dans une solution donnée.

Pour la mesure du pH les résultats obtenus pour les trois lots du vaccin sont respectivement 6,9 6.5, 7.00, ces valeurs montrent bien la conformité du vaccin DTcoq aux normes de la pharmacopée européenne, qui prévoit des valeurs de pH pour les préparations injectable entre (6 et 7) ; selon le **HIR(2001)** : les préparations injectables ne doivent pas s'éloigner de la neutralité.

Concernant le troisième paramètre, le taux de chlorures dans les trois lots de vaccin sont respectivement 9.2248, 8.7252, 8.8533mg/ml, et qui se trouvent parfaitement dans l'intervalle(8.5-9.5mg/ml) exigés par la pharmacopée européenne, ce qui est expliqué que le taux de chlorure à bien été respectée lors de la fabrication du vaccin DTcoq ; selon (**AIACHE et al., 2011**) : les préparations injectable doivent être isotonique au sang et au liquide de l'organisme c'est-à-dire doivent posséder la pression osmotique que le sang, cet isotonie est obtenue par addition de substance particulière tel que di chlorure de sodium. Les solutions injectables de chlorure de sodium isotonique contiennent 9g/l de chlorure de sodium.

Pareil pour la teneur d'aluminium vérifié dans les trois lots du vaccin, les mesures respectives sont 0.6407, 0.6677, 0.6879 mg/dose et se trouvent inférieure à 1.25mg/dose et donc conforme à la norme exigés par la pharmacopée européenne ; selon **GOURIER et FRERY(2004)** : quelque soit la voie d'exposition l'absorption de l'aluminium est faible (pour les voies orales et cutanés).

Pour le dernier paramètre mentionné dans le tableau IV ; le thiomersal se présente en concentration respectives 0.0410, 0.0425, 0.03705 mg/dose ces dernières se trouvent bien inférieure à 0.05mg/dose, ces résultats sont conformes à la pharmacopée européenne ; Les autorités responsables de la sécurité des vaccins et sérums exigent la présence d'un conservateur dans les flacons multi-doses. Le thiomersal (éthyl-mercure) est la substance la plus efficace contre les contaminations, la plus souvent utilisée dans le monde entier, et donc la mieux étudiée et puisque il contient l'éthyle mercure et comme il n'est pas accumulé au niveau de l'organisme donc il n'est pas toxique (**Siegrist, 2010**).

III-2- Résultats du contrôle immunologique (test d'identification):

Les résultats du test d'identité pour les trois lots de vaccins où nous avons vérifié la présence ou l'absence d'Arc de précipitation entre Ag (principe actif du vaccin)et Ac (sérum de référence) ,sont portés sur le tableau si dessous :

Tableau V : Résultats du test d'identification

Lots	Formation d'Arc de précipitation entre L'Ag et l'Ac
1	Résultat positif
2	Résultat positif
3	Résultat positif

Les résultats mentionnés dans le tableau V est signifié par la présence d'arcs de précipitation, et la présence d'arc de précipitation révèle l'identité du principe actif ; par utilisation d'Ac de références :

- Le sérum anti tétanique qui a identifié la présence de l'anatoxine tétanique
- Le sérum anti diphtérique qui a identifié l'anatoxine diphtérique.

Donc notre vaccin DTcoq comporte bien le principe actif à savoir l'Ac de référence, ce qui suggère que notre vaccin est efficace ; Selon la **Pharmacopée Européenne(2005)** : un résultat positif signifie formation d'arcs de précipitation entre l'Ag et l'Ac, et l'absence d'arcs de précipitation entre l'Ag et l'Ac est déterminée par un résultat négatif.

III -3- Résultats du contrôle microbiologique (test de stérilité)

Les résultats de l'essai de stérilité pour les lots contrôlés sont portés sur le tableau ci dessous :

Tableau VI : Résultats du test de stérilité

Lots	Milieu TG	Milieu TSB	Interprétation
1	Absence de trouble	Absence de trouble	Stérile
2	Absence de trouble	Absence de trouble	Stérile
3	Absence de trouble	Absence de trouble	Stérile

Les données du tableau VI permet de constater l'absence de trouble des deux milieux (milieu TG et milieu TSB) après leur incubation (pendant 14jours) ; l'absence de toute prolifération microbienne indique le respect des conditions de fabrication et le respect des règles d'hygiène. Selon le **HIR (2001)**, toutes préparations injectables doit être stériles et tout produit présenté

comme stérile doit répondre à l'essai de stérilité de la **Pharmacopée Européenne (2005)** ; donc les lots du vaccin DTcoq sont stériles et conformes.



Figure 15: Aspect des deux milieux de culture (TG et TSB) après incubation (Originale).

III-4- Résultats du contrôle toxicologique

Pour ce contrôle nous avons effectués deux tests :

- La toxicité anormale afin de s'assurer de la non toxicité des excipients du vaccin ;
- La toxicité spécifique : pour s'assurer de la non toxicité due au principe actif du vaccin DTcoq.

III-4-1- Résultats de la toxicité anormale

Les résultats de la prise du poids et l'observation des animaux (souris et cobayes) après leur inoculation par le vaccin DTcoq pour les deux essais effectués sur les souris et un essai sur les cobayes pour les trois lots sont présentés dans les tableaux suivants :

TableauVII : Résultats de la toxicité anormale pour le lot 1 du vaccin DTcoq:

Essai	Souris	Poids(g) J ₀	Observations			Poids(g) J ₃	Observations			Poids(g) J ₇	Différence de poids(g) (J ₇ .J ₀)
			J ₁	J ₂	J ₃		J ₄	J ₅	J ₆		
1	TR ₁	18,12	0	0	0	20,53	0	0	0	21,30	+3,18
1	QR ₁	18,90	0	0	0	19,76	0	0	0	20,87	+1,97
1	TB ₁	20,22	0	0	0	21,74	0	0	0	25,70	+5,48
1	QB ₁	20,57	0	0	0	22,33	0	0	0	26,13	+5,56
1	TRQB ₁	21,36	0	0	0	18,12	0	0	0	22,70	+1,34
1	T ₁	17,06	0	0	0	18,14	0	0	0	20,17	+3,11
2	TR ₂	17,70	0	0	0	17,73	0	0	0	20,11	+2,41
2	QB ₂	19,44	0	0	0	20,73	0	0	0	22,50	+3,06
2	TB ₂	19,54	0	0	0	21,11	0	0	0	22,90	+3,36
2	QB ₂	19,42	0	0	0	21,28	0	0	0	23,70	+4,30
2	TRQB ₂	18,90	0	0	0	20,33	0	0	0	22,11	+3,21
2	T ₂	16,82	0	0	0	18,56	0	0	0	20,60	+3,78
Cobayes	TR	335	0	0	0	338	0	0	0	355	+20
Cobayes	QR	345	0	0	0	350	0	0	0	360	+15
Cobayes	T	240	0	0	0	245	0	0	0	280	+40

Remarque : nous avons utilisé les symboles ci- dessous pour montrer que :

- (0) Animal en bonne santé.
- (M) Animal malade.
- (+) Animal mort.

D'après ces résultats on note une augmentation relative du poids des animaux du j_0 (poids avant l'inoculation) jusqu'à j_7 à la fin de la période d'observation.

Tableau VIII : Résultats de la toxicité anormale pour le lot 2 du vaccin DTcoq:

Essai	Souris	Poids (g) J_0	Observations			Poids (g) J_3	Observations			Poids (g) J_7	Différence de poids(g) (J_7-J_0)
			J_1	J_2	J_3		J_4	J_5	J_6		
Souris 1	TR ₁	19,54	0	0	0	22,34	0	0	0	24,42	+4,88
1	QR ₁	19,66	0	0	0	21,76	0	0	0	23,25	+3,59
1	TB ₁	18,42	0	0	0	21,95	0	0	0	23,86	+5,44
1	QB ₁	18,98	0	0	0	23,10	0	0	0	25,24	+6,26
1	TRQB ₁	18,75	0	0	0	21,80	0	0	0	24,07	+5,32
1	T ₁	21,44	0	0	0	23,88	0	0	0	24,90	+3,46
2	TR ₂	19,42	0	0	0	22,46	0	0	0	25,92	+6,5
2	QR ₂	19,08	0	0	0	22,88	0	0	0	24,74	+5,67
2	TB ₂	19,92	0	0	0	21,00	0	0	0	22,58	+2,66
2	QB ₂	21,16	0	0	0	23,75	0	0	0	25,32	+4,16
2	TRQB ₂	20,11	0	0	0	22,70	0	0	0	24,57	+4,46
2	T ₂	20,02	0	0	0	12,09	0	0	0	22,25	+2,23
Cobayes	TR	315	0	0	0	330	0	0	0	350	+35
Cobayes	QR	255	0	0	0	260	0	0	0	270	+15
Cobayes	T	260	0	0	0	280	0	0	0	300	+40

Les résultats obtenue après 7jours d'inoculation du vaccin DTcoq du deuxième lot montrent bien un gain poids avec absence de symptôme de maladie et de mortalité comme retrouvé chez les animaux inoculés par le vaccin du premier lot.

TableauX : Résultats de la toxicité anormale pour le lot 3 du vaccin DTcoq:

Essai	Souris	Poids(g) J ₀	Observations			Poids(g) J ₃	Observations			Poids(g) J ₇	Différence de poids(g) (J ₇ .J ₀)
			J ₁	J ₂	J ₃		J ₄	J ₅	J ₆		
1	TR ₁	19,40	0	0	0	21,83	0	0	0	23,93	+4,53
1	QR ₁	20,22	0	0	0	23,23	0	0	0	27,05	+6,83
1	TB ₁	20,71	0	0	0	24,34	0	0	0	27,82	+7,11
1	QB ₁	21,74	0	0	0	23,36	0	0	0	25,44	+3,70
1	TRQB ₁	19,32	0	0	0	21,06	0	0	0	24,13	+4,81
1	T ₁	18,79	0	0	0	22,52	0	0	0	24,95	+6,16
2	TR ₂	18,30	0	0	0	21,03	0	0	0	24,14	+5,84
2	QB ₂	20,51	0	0	0	21,22	0	0	0	21,65	+1,14
2	TB ₂	18,83	0	0	0	20,43	0	0	0	21,64	+2,81
2	QB ₂	20,05	0	0	0	21,71	0	0	0	23,44	+3,39
2	TRQB ₂	21,22	0	0	0	23,64	0	0	0	25,92	+4,70
2	T ₂	17,66	0	0	0	19,16	0	0	0	21,15	+3,49
Cobayes	TR	265	0	0	0	220	0	0	0	335	+70
Cobayes	QR	355	0	0	0	360	0	0	0	405	+50
Cobayes	T	370	0	0	0	360	0	0	0	410	+40

Les résultats de l'inoculation par le vaccin du troisième lot sont semblable à ceux obtenus pour le premier et le deuxième lot de vaccin DTcoq et montrent bien une augmentation du poids des animaux ce qui peut se traduire par le respect des conditions de nourriture et d'hygiène mais aussi indiquent que l'inoculation du vaccin n'est pas toxique.

Selon la Pharmacopée Européenne (2005) : aucun animal ne doit mourir ou montrer des signes de maladie durant la période d'observation et 80% d'animaux doivent survivre durant la période d'essai.

III-4-2- Résultats pour la toxicité spécifique

La toxicité spécifique de la coqueluche chez les souris permet de déterminer que *Bordetella pertussis* a bien été inactivé, cette procédure décrit un gain de poids des souris pour la valence coqueluche dans les vaccins adsorbés. Pour cela nous avons utilisé 10souris inoculées au vaccin DTcoq des trois lots et 10souris témoins inoculées par de l'eau physiologique contenant du thiomersal.

Les résultats de la prise de poids et de l'observation des souris sur une période de 7jours sont présentés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau X : Résultats de la toxicité spécifique pour le lot 1 du vaccin DTcoq:

Souris	Poids(g) J ₀	Observations			Poids(g) J ₃	Observations			Poids(g) J ₇	Différences de poids(g) J ₇ -J ₀
		J ₁	J ₂	J ₃		J ₄	J ₅	J ₆		
OF1	147,95	0	0	0	164,80	0	+	0	375,23	+227,28
témoins	154,55	0	0	0	177,62	0	0	0	221,64	+67,09

Les données du tableau X montrent un gain de poids évident aussi bien au troisième jour qu'au cinquième jour de l'inoculation.

Néanmoins, on note le décès d'une souris parmi les 10 inoculés au vaccin DTcoq ; le taux de mortalités de souris ne dépassant pas 5% pour les deux groupes de souris témoin et vaccinées et donc validées selon la pharmacopée Européenne.

Tableau XI : Résultats de la toxicité spécifique pour le lot 2 du vaccin DTcoq:

Souris	Poids(g) J ₀	Observations			Poids(g) J ₃	Observations			Poids(g) J ₇	Différences de poids(g) J ₇ -J ₀
		J ₁	J ₂	J ₃		J ₄	J ₅	J ₆		
OF1	152,19	0	0	0	185,88	0	0	0	227,08	+74,89
témoins	152	0	0	0	188,72	0	0	0	210,64	+58,64

Les résultats du tableau XI montrent uniquement un gain de poids au 3^{ème} jour jusqu'à 7^{ème} jour d'observation, ce qui est en faveur de l'inoculation au vaccin.

Tableau XII : résultats de la toxicité spécifique pour le lot 3 du vaccin DTcoq:

Souris	Poids(g) J ₀	Observations			Poids(g) J ₃	Observations			Poids(g) J ₇	Différences de poids(g) J ₇ -J ₀
		J ₁	J ₂	J ₃		J ₄	J ₅	J ₆		
OF1	145	0	0	0	160	0	0	0	189,76	+44,76
témoins	145	0	0	0	162,28	0	0	0	198,89	+53,89

Les animaux inoculés par le troisième lot de vaccin présentent une augmentation de poids considérable comme déjà observés pour les animaux inoculés par le premier et le deuxième lot du vaccin ; quant à l'observation des souris après inoculation on note ni mortalité ni symptôme de maladie ce qui peut se traduire par la non toxicité du principe actif du vaccin.

Les résultats de la toxicité spécifique rapportés indiquent un bon respect des conditions d'hygiène et de nourriture, mais affirment aussi que le thiomersal : conservateur utilisé dans notre vaccin n'est en aucun cas toxique.

Selon la Pharmacopée Européenne, 2005 : Le vaccin est conforme à l'essai de toxicité spécifique ; où nous avons eu après 72h un poids qui n'est pas inférieur à celui avant l'injection dans le groupe de vaccin ; et au bout de 7jours l'augmentation moyenne de poids individuel dans le groupe vaccin n'est pas inférieur à 60% des souris du poids moyen du groupe témoin. Aussi, pas plus de 5% des souris sont mortes pendant l'essai.

Conclusion

Conclusion

La présente étude, réalisée à l'institut Pasteur d'Algérie, porte essentiellement sur le contrôle de la qualité d'un produit injectable : vaccin DTcoq importé, pour cela nous avons réalisé plusieurs contrôles, à savoir :

Le contrôle physico-chimiques de plusieurs paramètres (Aspect, pH, NaCl, Thiomersal, Alumunium) dont les résultats étaient conformes aux normes de l'organisation mondiale de la santé(2005) et la Pharmacopée Européenne(2005).

Le contrôle immunologique (test d'identité) nous a permis d'identifier le principe actif, ainsi l'efficacité du vaccin est assurée.

Le contrôle microbiologique rapporte que le vaccin est bien stérile cette caractéristique doit être respectée surtout pour l'usage parentéral.

En dernier, le contrôle toxicologique réalisé sur des animaux rapporte bien que le vaccin DTcoq n'est pas toxique.

Aux termes de ce travail et dans le but de garantir la qualité du vaccin DTcoq nous avons démontré que le vaccin DTcoq importé par l'Algérie est d'une bonne qualité de plus il n'est pas néfaste pour l'homme, il est donc déclaré par l'Institut Pasteur d'Alger valide pour sa distribution.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

AIACHE.S, AIACHE. R, RENOUX, 2001 : Initiation à la connaissance du médicament, 4^{ème} édition, Ed : Elsevier Masson : 318P.

AIACHE.G-M, TARDOT.G-M, HOSSART.V, 2011 : Médicament et autre produit de santé, Ed: Elsevier Masson:304P.

ARTHUR.M, GALAZKA, OMS, 1993 : Les bases immunologiques de la vaccination, Ed : Genève : 1P.

BELOUNLR, 2009 : Manuel de microbiologie OPU.

BOURGEOIS. CM, LEVEAU.JY, 2009 : Technique d'analyse et de contrôle dans l'industrie agro-alimentaire, Ed : Masson, volume 3 :447P.

BELCHERA.R, D.GIBBONSA, TS.WESTA, 1999 : Chimica analytica, volume 13 : 226-229P.

BEYTOUT.J, LAURICHESSE.H, REY.M, 2001 : Vaccinations Encyclopédies Médico-chirurgicale, Ed : scientifiques et médicale, Elsevier SAS, Paris, maladies infectieuses, 8-002-Q-10 :14P.

BACKER. JP, 2008 : Le mercure, le vaccin et l'autisme : une controverse, trois histoires.

CHARLES.A, JANEWAY, KENNETH MURPHY, PAUL TRAVERS et MARK, 2009 : Walport, Immunobiologie, 3^{ème} édition, traduction de Pierre L. Ed : Masson, De Boeck.

DOMINIQUE PRADEAU, 1992 : Analyse pratique du médicament, Paris : 168-264-279P.

DELAMARE C, 2001 : Assurance qualité- annale de biologie clinique, Ed : Elsevier, Masson : 59-69P.

GUIDE DES VACCINATIONS ALGERIE, 1988 : Unicef, direction de la prévention, institut national de santé publique, institut Pasteur d'Algérie : 20-21-44P.

GIRARD. M, LEON HIRTH, JEAN WITZ, GENIVIEVE.L, 1989 : Virologie moléculaire, Ed : Masson, Paris : 570P.

GENTILINI.M, 2001 : Tétanos, médecine tropicale, collection médecine science Flammarion ,6^{ème} édition.

- GORIER-FRERY.C, FRERY. N, 2004:** EMC. Toxicologie pathologie, France : 79 -95P.
- GERACFAS, 2007 :** Modules AS, aide soignant: Module 3, les soins, Elsevier Masson, volume 3 :1P.
- IVAN ROITT, JOHNTHAN BROSTOFF, DAVID MALE, 2002:** immunologie, Belgique, Ed : De Boeck.
- JEAN-PIERRE REGNAULT,2002 :** Elément de microbiologie et d'immunologie : 513-514-515-516-517-549-550-551P.
- LE HIR.A, 2001 :** Pharmacie galénique, bonnes pratiques de fabrication des médicaments, 8^{ème} édition, Paris : 10-11P.
- LE COZE.E, 2003 :** Système de management de la qualité AG 1752-1. Technique de l'ingénieur, traité l'entreprise industrielle.
- MONTMEAS. L, J.PRODHOMME, OURLIAC. S, PUCELLE .L, 2006 :** Manipulations et interventions sur les bovins Par Collectif, deuxième édition, Ed : Educagri : 103P.
- OMS(2000) :** Assurance de la qualité des produits pharmaceutiques, volume 1, Ed : OMS. Genève : 37P.
- OMS(2005) :** Série de rapport technique, N°931, (1^{er} rapport du comité OMS d'expert de la standardisation biologique) :11P.
- Pharmacopée Européenne, 1997 :** 14-72-81-1732P.
- Pharmacopée Européenne, 2002.**
- Pharmacopée Européenne, 2005.**
- Pharmacopée Européenne, 2006.**
- Pharmacopée Européenne, 2008.**
- PATRICE SALGAROLO, 2003 :** Pratique des manipulations de chimie à l'usage de biologiste, Paris, 2^{ème} édition, diffusion par TEC et DOC Lavoisier : 31-34P.
- PATRICK BERCHE, JOHN LIBBEY :** Histoire des microbes : 216 -217P.
- PATRICK CHASTELLAN, MARIE PAULE, 1994 :** principe des techniques immunologiques d'application courante en analyse médicale.
- PRADEAU DOMINIQUE, 1992 :** analyse pratique du médicament, Paris : 168-264-279.
- PRUGNAUD, 2003:** les vaccins à AND, Annales pharmaceutique français, vol 61, n°4 :219-233P. Article.

- REY.M, 1980:** Vaccinations, 2^{ème}exemplaire, Paris, New York, Barcelone, Milan : 1P.
- RICHARD. A, THOMAS. J, BARBARA. A, JANIS. KUBY, 2001 :** Immunologie, Paris : 458P.
- SUSSLAND. W-A, 1996 :** Le manager, la qualité et les normes iso, Ed : Presse polytechnique et universitaire romands : 12P.
- SMANS. PH, VERLEST.G, 1997 :** Qualité assuré, du système qualité à la certification, édition Française AFNOR : 187P.
- SKOOG, WEST, HOLLER, 2002 :** Chimie analytique, 1^{ère} édition, Italie, Ed : Boeck : 271-829P.
- Sigrist, 2010 :** Vaccinologie. Questions autour de la sécurité des vaccins adjuvants contre la grippe A(H1N1). Revue Médicale Suisse N° 231 .Article de C-A.
- VANDEVILLE.P, 1983 :** Gestion et contrôle de la qualité, association française de normalisation, Ed : Masson, Paris : 134P.

Annexes

Annexe1

Verreries et autres

Pipettes graduée

Erlen Meyer

Barreau magnétique

Burette

Matras

Ampoules à décantation avec bouchon

Cuves en quartz de spectrophotométrie UV-visible

Tube conique

Bain marie

Lames

Béchers

Plaque chauffante

Emporte pièce

Boîtes de pétri stériles

Bec bunsen

Seringue stérile

Ciseaux

Tubes à essai à vis stériles

Pipette pasteur

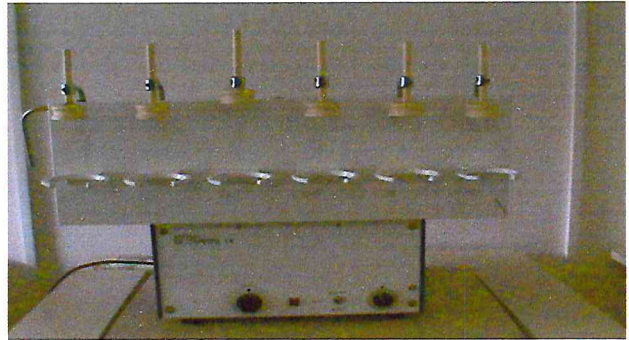
Cristalliseur

Annexe2

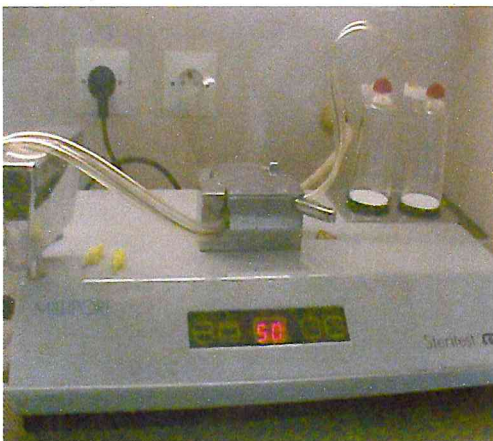
Appareillage



pH mètre



Agitateur



Stéritest



Spectrophotomètre



Centrifugeuse

Annexe3



Figure : Ampoules à décantation au moment de l'agitation



Figure : Gamme d'étalonnage après extraction

Annexe4

1) Contrôle physico-chimique :

a) Dosage du thiomersal :

Les réactifs utilisés pour le dosage du thiomersal

-Solution étalon aqueuse de thiomersal à 0,01%(0,1g dans 100ml d'eau distillée correspond à 1mg/ml) ;

-Solution d'acétate d'ammonium à 1%(tampon acétate),
pH=6(1gd'acétate d'ammonium dans 100ml d'eau distillée) ;

-Dilution au 1/10^{ème} d'une solution de dithizone (diphénylcarbazon) fraîchement préparé à 0,01%(0,01g de dithizone dans 100ml de chloroforme).

b) Pour le dosage de l'aluminium :

Préparation des solutions :

a) **Solution concentrée de NaOH (10 N) :** soit 42 g dans 100 ml.

b) **Le méthyle orange :** soit 0,1 g de méthyle orange dans 80 ml d'eau et compléter à 100ml avec de l'alcool.

c) **Solution de pyridyl Azo -Naphtol :** soit 1 % m/v dans l'éthanol à 35%.

d) **EDETATE de Na à 0,02M :** Soit 7,444 g d'EDTA de Na dans 1l d'eau.

e) **Solution dilué de H₂SO₄ (2N) :** Contient 9,8% m/v, soit 60ml d'eau distillée ajouter prudemment 5,5ml de H₂SO₄, laisser refroidir, compléter à 100ml.

f) **Solution de CuSO₄ à 0,02M :** soit 5g de CuSO₄ dans 1l d'eau.

g) **Solution tampon acétate :** dissolvez 68g d'acétate de Na et 38,5g d'acétate d'ammonium, compléter à 500ml (QSP500ml) puis ajouter 125ml d'acide acétique glacial, et mélanger.

Annexe 5

2) Contrôle immunologique (test d'identité) :

a) Les réactifs utilisés pour le test d'identité :

- **Préparation du gel d'agarose** : dans un erlenmeyer on introduit 1g d'agarose on solubilise par ajout de 100ml de tampon Phosphate Buffered Saline (PBS à pH : 7,4). On dépose l'erlenmeyer dans un bécher rempli d'eau lui même déposé sur une plaque chauffante ; on met un barreau magnétique dans l'erlenmeyer et on chauffe à une température de 200 °C et on laisse jusqu'à ce que la gélose devienne limpide.

- Pour le Bleu de comassie :

Bleu de comassie 3g

- Pour la solution de décoloration :

Méthanol 450ml

Acide acétique 100ml

Eau distillé QSP 1000ml

- Pour le tampon PBS :(Phosphate Buffered Saline) à pH 7,4 :

Dissolvez 1,183g de di sodium hydrogène phosphate di hydrate et 0,19g de potassium di hydrate phosphate et 8g de sodium chloride dans 800ml d'eau.

Ajuster le pH à 7,4 en utilisant la solution de dilution de NaOH ou HCL, puis ajuster le volume final à 1000ml en utilisant une éprouvette.

b) Préparation de dilutions utilisées dans le test d'identité :

On utilise des sérums de références : sérum anti diphtérique et sérum anti tétanique, chaque sérum de référence est dilué au 1/1000^{ème} comme suit :

1/10^{ème} : 90µl du PBS+10µl de sérum de référence (première dilution)

1/100^{ème} : 90µl du PBS+10µl de la première dilution(deuxième dilution)

1/1000^{ème} : 90µl du PBS+10µl de la deuxième dilution (troisième dilution)

3) Contrôle microbiologique (test de stérilité)

Milieux de culture utilisés dans le test de stérilité

Milieu liquide au thioglycolate

L-cystine.....	00,50g
Agar en granules.....	00,75g
Chlorure de sodium	02,50g
Glucose monohydrate.....	05,50g
Extrait de levure (hydrosoluble)	05,00g
Hydrolysate pancréatique de caséine.....	15,00g
Thioglycolate de sodium	00,50g
Solution de resazurine sodique.....	01,00ml
Eau R	1000ml

pH du milieu après stérilisation : $7,1 \pm 0,2$

Soja Agar

Composition :

Digestion pancréatique de caséine.....	15g
Peptone de soja	05g
Chlorure de sodium	05g
Agar bactériologique.....	15g

4) Contrôle toxicologique

a) Toxicité anormal

Lot/test	souris	cobayes	souris	cobayes	souris	cobayes
Numéro du lot	E2197-1 (1)		E2188-A (2)		D2252-1 (3)	
Date de péremption	03/2012		04/2011		04/2011	
Date d'inoculation	20/03/2011	01/03/2011	22/03/2011	01/03/2011	24/03/2011	01/03/2011
Voie d'inoculation	intra péritonéale		intra péritonéale		intra péritonéale	
Sexe	Femelle		mal		femelle	

b) Toxicité spécifique

Numéro du lot	E2197-1 (1)	E2188-A (2)	D2252-1 (3)
Date de péremption	03/2012	04/2011	04/2011
Voie d'inoculation	intra péritonéale	intra péritonéale	intra péritonéale
Sexe	Femelle	mal	mal
Date d'inoculation	08/03/2011	09/03/2011	10/03/2011