

Évaluation de la contamination par les endotoxines bactériennes de certaines formes pharmaceutiques injectables et en collyres au Laboratoire National de la Santé du Mali

Assessment of bacterial endotoxin contamination of selected injectable and eye drops at the National Health Laboratory of Mali

Garango.D^{1,*}, Mohamed.AB^{2,3}, Dembélé.S¹, Dembélé.O¹, Guindo.I^{2,3}, Diallo.T^{2,3},
Bougoudogo.F²

¹Laboratoire National de la Santé,

²Faculté de Pharmacie,

³Institut National de Santé Publique.

***Auteur Correspondant** : Dr Diénéba Garango : garango_dieneba@yahoo.fr. Tél: 00223 66783991 / 77868071
Laboratoire National de la Santé BP: E 4559, Tél: 00223 20224770, Bamako Mali.

Résumé

Les endotoxines bactériennes (lipopolysaccharides) issues des bactéries à Gram négatif représentent l'un des principaux contaminants pyrogènes dans les médicaments injectables et les collyres, pouvant entraîner des réactions indésirables graves chez le patient. Notre étude avait pour objectif d'évaluer la contamination par les endotoxines bactériennes de certaines formes pharmaceutiques injectables et en collyres au Laboratoire National de la Santé du Mali. Une étude descriptive transversale a été menée de janvier à décembre 2021. Au total, 55 échantillons de médicaments (50 formes injectables et 5 collyres ophtalmiques) ont été prélevés de manière aléatoire auprès de 4 grossistes pharmaceutiques du Mali. Plusieurs méthodes ont permis de rechercher les endotoxines, dont la technique du gel et du caillot, la technique turbidimétrique et la technique chromogène. La recherche des endotoxines bactériennes a été réalisée selon la première technique (méthode de gélification du Lysat d'Amébocyte de Limule), conformément aux exigences de la pharmacopée américaine. Tous les échantillons analysés étaient conformes aux normes de la pharmacopée, avec un taux de conformité de 100 %. Les médicaments testés étaient majoritairement des génériques de marque (37/55, soit 67,3 %) contre 18 spécialités sous DCI (32,7 %). Cette étude a démontré l'absence de contamination par les endotoxines bactériennes dans les lots de médicaments injectables et collyres contrôlés au Laboratoire National de Santé dans le service de microbiologie. La technique de gélification utilisée s'est révélée fiable et conforme aux recommandations des pharmacopées. Ces résultats soulignent la bonne qualité microbiologique des produits échantillonnés sur le marché malien.

Mots clés : Endotoxines bactériennes, Contrôle de qualité, Médicaments, Laboratoire National de la Santé

ABSTRACT

Bacterial endotoxins (lipopolysaccharides) from Gram-negative bacteria are one of the main pyrogenic contaminants in injectable drugs and eye drops, which can lead to serious adverse reactions in the patient. The objective of our study was to evaluate the presence of bacterial endotoxins in pharmaceutical drugs at the National Health Laboratory of Mali, focusing on injectable preparations and eye drops. A cross-sectional descriptive study was conducted from January to December 2021. A total of 55 drug samples (50 injectable forms and 5 ophthalmic eye drops) were randomly collected from 4 pharmaceutical wholesalers in Mali. Several methods have been used to detect endotoxins: the gel-clot technique, the turbidimetric technique, and the chromogenic technique. The search for bacterial endotoxins was carried out using the gel or clot formation technique (Horseshoe Crab Amebocyte Lysate gelation method), in accordance with the requirements of the American's pharmacopoeia. All samples analyzed were compliant with pharmacopoeia standards, with a 100% compliance rate. The majority of the drugs tested were branded generics (37/55, or 67.3%) compared to 18 specialties under INNs (32.7%). This study demonstrates the absence of contamination by bacterial endotoxins in batches of injectable drugs and eye drops controlled at the National Health Laboratory. The gelling technique used proved to be reliable and in accordance with pharmacopoeia recommendations. These results underline the good microbiological quality of the products sampled on the Malian market.

Keywords: Bacterial endotoxins, Quality control, Drugs, National health laboratory.

INTRODUCTION

Les endotoxines sont des lipopolysaccharides (LPS) constitutifs de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Elles sont issues principalement de ces bactéries, elles représentent la cause la plus fréquente de réactions pyrogènes et toxiques liées à la contamination des produits pharmaceutiques. Ces molécules se caractérisent par une activité pyrogène nettement supérieure à celle des autres pyrogènes connus. Les endotoxines n'agissent pas directement sur les cellules de l'hôte. Libérées lors de la lyse bactérienne ou de la multiplication des microorganismes, elles induisent une réponse immunitaire excessive via la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (cytokines). Cette réaction peut entraîner une fièvre, des frissons, un choc endotoxique, une coagulation intravasculaire disséminée et, dans les cas graves, une défaillance multi viscérale [1-3]. Paradoxalement, ces mêmes endotoxines possèdent également des propriétés immunostimulantes et ont fait l'objet de recherches pour leurs applications en immunothérapie [1-3]. Cependant, dans le contexte pharmaceutique, leur présence est hautement indésirable, notamment dans les préparations injectables et les collyres ophtalmiques, qui entrent directement en contact avec la circulation sanguine ou les tissus sensibles. Ces deux formes pharmaceutiques stériles sont destinées à l'administration intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intra-artérielle, intraoculaire, topique ou oculaire [4,5]. Leur administration impose l'absence totale de substances pyrogènes, conformément aux exigences strictes des pharmacopées (européennes, américaines) et des autorités sanitaires [6,7].

Les techniques de recherche d'endotoxines bactériennes décrites dans les Pharmacopées sont diverses : la technique du gel et du caillot, basée sur la formation d'un gel, la technique turbidimétrique, basée sur le développement d'une turbidité après clivage d'un substrat endogène et la technique chromogène, basée sur le développement de la couleur après clivage d'un complexe peptide synthétique-chromogène.

[6-8]. L'essai des endotoxines bactériennes (EEB) est destiné à la détection ou à la quantification des endotoxines produites par des bactéries Gram négatives, au moyen d'un

lysate d'améboocytes de limule (*Limulus polyphemus* ou *Tachypleus tridentatus*) provenant du sang de limule qui coagule en présence d'une concentration minimale d'endotoxine bactérienne. Le test du lysate d'améboocyte de limule (L.A.L) est un test enzymatique qui consiste en une activation par les endotoxines d'une enzyme spécifique, la coagulase, en présence de cations bivalents. Ainsi l'enzyme activée clive la protéine coagulante (coagulogène) en sous-unités qui s'agrègent pour former un gel.

L'étude a été réalisée dans le cadre du renforcement du plateau technique en tenant compte de tous les paramètres de qualité et de conformité des médicaments au laboratoire national de la santé.

Le contrôle de la qualité microbiologique, notamment la recherche et la quantification des endotoxines bactériennes par la technique du Lysate d'Améboocyte de Limule (LAL), réalisée pour la première fois au laboratoire national de santé constitue un paramètre essentiel de l'assurance qualité des médicaments injectables et ophtalmiques. Par ailleurs Rafa A, Taib K ont utilisé cette même technique sur du precortyl® 5mg en 2017 et Mersellab MS sur une solution injectable clofenal 75mg/3 mL en 2015.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

❖ Lieu et période de l'étude

L'étude a été réalisée au laboratoire national de la santé de janvier à décembre 2021.

❖ Échantillons

55 échantillons (50 préparations injectables et 5 collyres) ont fait l'objet d'une évaluation qualitative, collectés de manière partenariale avec la Direction du médicament et de la pharmacie (DPM) et 4 grossistes.

❖ Matériels et réactifs

Petit matériel de laboratoire apyrogène, bain-marie, thermomètre et chronomètre, Endotoxine de référence lyophilisée, Lysate d'améboocytes de limule (LAL) de sensibilité 0,125 UE/mL et Eau LAL apyrogène conditionnée en flacons stériles.

❖ Environnement de travail

Tous les essais ont été réalisés dans le laboratoire de microbiologie du lns, sur une paillasse apyrogène, dans des conditions strictement contrôlées afin d'éviter toute contamination exogène.

❖ Méthodes

La recherche des endotoxines bactériennes a été réalisée selon le chapitre <85> de la Pharmacopée de 2024. La technique utilisée était la méthode de gélification (gel-clot), qui permet à la fois la détection et la quantification des endotoxines.

La procédure a suivi les étapes suivantes :

1. Confirmation de la sensibilité du lysat

La sensibilité de chaque lot de lysat a été vérifiée avant utilisation. Des dilutions sériées de l'endotoxine de référence ont été préparées, additionnées de lysat LAL, puis incubées à 37 ± 1 °C pendant 60 ± 2 minutes. Après incubation, les tubes ont été doucement inversés à 180°. Un résultat est positif en cas de formation d'un gel solide qui reste intact lors de l'inversion, et négatif dans le cas contraire [6].

La sensibilité du lysat a été calculée comme l'antilogarithme de la moyenne des logarithmes de la plus faible concentration d'endotoxine donnant un résultat positif. La sensibilité mesurée devait se situer entre 0,5 et 2 fois la sensibilité nominale indiquée par le fabricant [6].

2. Test d'inhibition / facteurs d'interférence

Ce test a été réalisé de la même manière que la confirmation de sensibilité, mais en diluant l'endotoxine de référence dans la solution à tester préalablement diluée à la Dilution Maximale Significative (DMS), calculée comme suit :

$$\text{DMS} = \frac{\text{Limite en endotoxine} \times \text{concentration de l'échantillon}}{\text{Sensibilité du lysat}}$$

Le produit est considéré comme non interférant si la sensibilité trouvée est comprise dans un intervalle allant de la moitié à 2 fois la sensibilité trouvée lors du test de confirmation de la sensibilité du lysat. Dans le cas contraire, le produit est considéré comme interférant par inhibition ou par activation. Aucun de nos produits n'a interféré avec l'endotoxine de référence [6].

3. Test proprement dit

Chaque échantillon a été testé en double tout en subissant au préalable une dilution maximale significative. C'est la dilution maximale qui permet de s'assurer que le produit non dilué n'aura pas d'effet pyrogène [6].

Nous avons testé simultanément :

- Deux témoins négatifs constitués d'eau L.A.L.

- Deux témoins positifs (T+) contenant l'endotoxine à une concentration correspondant à 2 fois la sensibilité déclarée du lysat (dilution effectuée à l'aide de l'eau L.A.L.).
- Deux témoins positifs produits (T+p) contenant l'endotoxine à une concentration correspondant à 2 fois la sensibilité déclarée du lysat (dilution effectuée à l'aide de la solution à tester diluée au préalable à la DMS).
- Deux témoins du produit à examiner (uniquement l'échantillon à analyser).

Le produit contrôlé satisfait à l'essai si la réaction est négative dans les 2 témoins du produit à examiner. Tous nos échantillons ont satisfait à l'examen [2, 3, 7, 11].

Le produit est considéré comme non interférant si la sensibilité obtenue reste comprise entre 0,5 et 2 fois celle déterminée lors de la confirmation de sensibilité du lysat. Aucun des échantillons testés n'a présenté d'interférence (inhibition ou activation).

RÉSULTATS

La recherche des endotoxines bactériennes a été effectuée par la technique de gélification (selon la Pharmacopée Américaine (USP <85>), 2024 sur 55 échantillons de médicaments, dont 50 préparations injectables et 5 collyres ophtalmiques.

Aucune endotoxine n'a été détectée au-dessus de la limite acceptable dans les 55 échantillons analysés, soit un taux de conformité de 100 %. Les échantillons provenaient principalement du grossiste G2 (Tableau I). Les génériques de marque étaient majoritaires (38 échantillons, soit 67,3 %) par rapport aux spécialités sous DCI (18 échantillons, soit 32,7 %) (Tableau II).

Tableau I : Répartition des échantillons au niveau des grossistes (G)

Site de prélèvement	Nombre d'échantillons	%
G 1	12	21,82
G 2	29	52,72
G 3	5	9,10
G4	09	16,36
Total	55	100

Tableau II : Répartition des échantillons selon les catégories de médicaments

Structures	Catégories de médicaments	
	DCI	Génériques de marque
G 1	2	10
G 2	8	21
G 3	0	5
G 4	8	1
Total	18	37

DISCUSSION

Notre étude a utilisé la technique du gel et du caillot, basée sur la formation d'un gel. Le test de L.A.L, a confirmé l'absence d'endotoxines bactériennes dans les échantillons de médicaments analysés. Les résultats obtenus par Mersellab [11] *et al.* en Algérie en 2015 sont similaires aux nôtres. Les études réalisées par Ould *et al.* en 2009 en Algérie [09] et par Benattia en 2012 en Algérie [12] ont révélées que les produits formes injectables étaient tous apyrogènes. Le grossiste G2 était la plus représentée (Tableau I) et les génériques de marque étaient plus importants que les DCI (Tableau II). Tous les échantillons analysés étaient exempts d'endotoxines bactériennes. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que l'environnement de travail était exempt de substances apyrogènes. Les endotoxines sont dangereuses parce qu'elles provoquent des symptômes variés allant jusqu'à bloquer la circulation sanguine et à détruire les tissus qui devaient être protégés. Cependant, Ernest *et al.* en 1992 ont démontré qu'elles ne sont pas seulement nocives à l'homme mais renforcent aussi les défenses naturelles de l'organisme contre les bactéries, les virus et les cellules cancéreuses [1]. La technique de géification du Lysat d'Améboocyte de Limule (LAL) utilisée dans cette étude a permis de confirmer l'absence d'endotoxines bactériennes dans tous les échantillons testés. Ces résultats sont conformes à ceux rapportés par Mersellab *et al.* en Algérie en 2015 [11], ainsi qu'aux études d'Ould *et al.* en 2009 [9] et de Benattia en 2012 [12], qui avaient également conclu à l'apyrogénicité des préparations injectables analysées. La bonne qualité microbiologique observée dans cette étude peut s'expliquer par le respect des bonnes pratiques de fabrication, de stockage et de conservation par les établissements pharmaceutiques concernés, ainsi que par le strict contrôle de l'environnement de travail (matériel, paillasse

et eau apyrogènes) au Laboratoire National de Santé. Cependant les endotoxines bactériennes restent des contaminants potentiellement dangereux, car elles peuvent provoquer une réponse pyrogène sévère, allant de la fièvre et des frissons jusqu'au choc endotoxique et à la défaillance multiviscérale [1]. Paradoxalement, comme le soulignent Helmut Brade et Ernst Rietschel en 1992, ces mêmes molécules possèdent des propriétés immunostimulantes et peuvent renforcer les défenses naturelles de l'organisme contre les bactéries, les virus et les cellules cancéreuses [1].

CONCLUSION

Notre étude sur la recherche d'endotoxines bactériennes a permis de révéler que de gros efforts ont été fournis par les établissements pharmaceutiques visités dans le cadre du respect des bonnes pratiques de stockage et de conservation, élément crucial pour la qualité des médicaments. La recherche des endotoxines basée sur la méthode de formation d'un gel ou de caillot a révélé l'absence d'endotoxines bactériennes dans les échantillons de médicament analysés. Des études complémentaires à plus grande échelle, incluant des dosages quantitatifs et un échantillonnage plus représentatif du marché national, seraient nécessaires pour confirmer ces résultats et renforcer la surveillance de la qualité des médicaments injectables et ophtalmiques au Mali.

Conflit d'intérêt : aucun

RÉFÉRENCES

1. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am.* 1992;267(2):54-61. doi:10.1038/scientificamerican0892-54.
2. Rafa A, Taib K. Suivi de fabrication, contrôle physicochimique et microbiologique du médicament générique Precortyl® 5 mg [mémoire de master]. Bouira: Université Akli Mohand Oulhadj; 2017.
3. Gaye R. Les endotoxines bactériennes dans les préparations injectables : méthodes de détection et impact potentiel chez le patient [mémoire]. Batna: Université Batna 2; 2022. Disponible sur: <https://pharmacie.univ->

- batna2.dz/sites/default/files/pharmacie/files/preparations_parenterales.pdf. Consulté le 19 août 2025.
4. Université Batna 2. Les préparations ophtalmiques [Internet]. Batna: Université Batna 2; [consulté le 19 août 2025]. Disponible sur: <https://pharmacie.univ-batna2.dz>
 5. Centre hospitalier universitaire vaudois (CHUV). Administration des médicaments par voie intraveineuse aux soins intensifs adultes : évaluation et validation des pratiques par la littérature et des essais en laboratoire [Internet]. Lausanne: CHUV; [consulté le 20 août 2025]. Disponible sur: <https://www.chuv.ch>
 6. United States Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 47-NF 42). Rockville (MD): United States Pharmacopeial Convention; 2024. Disponible sur: <https://fr.slideshare.net/slideshow/united-state-pharmacopeia-47-nf-42-usp-2024/266302289>
 7. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). Pharmacopée Européenne. 11e éd. Strasbourg: EDQM; 2024. Chapitre général 0520 : Préparations parentérales. Disponible sur: <https://www.edqm.eu/documents>
 8. Boudier Y. Qualification d'un système de production et de distribution d'eau pour préparations injectables [thèse d'exercice]. Toulouse: Université Toulouse III Paul Sabatier; 2014.
 9. . Ould Bah, et al. Les solutés injectables (Prixam® 20 mg, Saidal Algérie) [mémoire]. Jijel: Université de Jijel; 2009. Disponible sur: <http://dspace.univ-jijel.dz:8080/xmlui/handle/123456789/6948>
 10. Conseil de l'Europe. Pharmacopée Européenne. 9e éd. Supplément 9.3. Strasbourg: EDQM; Chapitre 2.6.14. Essai des endotoxines bactériennes. p. 4985-4989.
 11. Mersellab MS. Contrôle physico-chimique, microbiologique et toxicologique d'une solution injectable Clofenal® 75 mg/3 mL [mémoire]. Khemis Miliana: Université Djilali Bounaâma; 2014. Disponible sur: <http://dspace.univ-km.dz>
 12. Benattia FK. La qualité microbiologique des médicaments [mémoire de master]. Tlemcen: Université Abou Bekr Belkaïd; 2012. Disponible sur: <http://dspace.univ-tlemcen.dz>