

**Problèmes posés par le contrôle des produits
d'origine biologique utilisés à des fins médicamenteuses**

Contrôle Français des Sérums, Vaccins et Produits Biologiques (*)

JEAN DESBORDES

Directeur au Laboratoire National de la Santé Publique, Paris, France

P L A N

POSITION DU PROBLEME.

- Les difficultés du contrôle biologique.
- Le calcul statistique.
- Plan général de l'essai biologique.*
- Problème des étalons.*
- Problèmes réglementaire et administratif.*

CHAPITRE I. — LA LEGISLATION EN FRANCE.

- Loi sur la vaccine.
- Le Codex 1908, le premier qui traite des préparations biologiques.
- Les Codex 1937 et de 1949.
- Le Codex 1965.
- Les spécialités pharmaceutiques à base de préparations biologiques.
- Loi du 6 Août 1953. Ordonnance du 4 Février 1960.
- Code de la Santé. Législation nouvelle 1959-60.
- Le visa. L'autorisation de débit.
- L'autorisation de mise sur le marché.

CHAPITRE II. — LES CONTROLES DE ROUTINE (communs à plusieurs produits biologiques).

- Contrôle de stérilité.*
- Vérification de l'absence de pouvoir pyrogène.*
- Vérification de l'absence de substances histaminiques.*
- Recherche de toxicité anormale.*

(*) Su questo argomento l'Autore ha tenuto una conferenza presso l'Istituto Superiore di Sanità il 27 gennaio 1969.

CHAPITRE III. — TITRAGE DES SERUMS ET VACCINS.

*Les anatoxines et les vaccins.**Les sérums.**Les auto-vaccins.*

CHAPITRE IV. — TITRAGE MICROBIOLOGIQUE DES ANTIBIOTIQUES.

*Méthode par diffusion.**Méthode turbidimétrique.**Conséquences analytiques de l'association d'antibiotiques.*

CHAPITRE V. — TITRAGES ET CONTROLES DIVERS.

*Vitamines.**Drogues végétales.**Produits d'origine animale (hormones, etc. ...).**Produits chimiques divers.**Produits réactifs biologiques.**Matériels divers.*

CHAPITRE VI. — PROBLEMES POSES PAR L'UTILISATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE.

*Organisation du contrôle sur le plan administratif.**Organisation du contrôle sur le plan technique.*

CONCLUSIONS.

POSITION DU PROBLEME

Les produits utilisés en thérapeutique qui sont d'origine biologique se trouvent souvent définis plus par leur origine même et leur préparation, que par les contrôles effectués sur le produit fini. Ils posent un certain nombre de problèmes quant à leur surveillance par les autorités sanitaires responsables de la puissance publique.

Ce sont le plus souvent des substances complexes tirées directement de la matière vivante (protistes, végétaux, animaux et même tissus humains). Ils ne sont pas chimiquement définissables le plus souvent ; mais ils le sont par leur action physiologique, biologique ou thérapeutique. Leurs qualités ou leurs défauts, leur activité, leur conformité ou non aux normes n'est que difficilement appréciable par les moyens chimiques ou physiques utilisés classiquement par les analystes. Bien souvent même, ces méthodes sont absolument impossibles à appliquer à cette classe de substance. En particulier le contrôle de leur activité n'est valable qu'en utilisant des moyens qualifiés eux aussi de « Biologiques », c'est-à-dire par l'étude des réponses d'organismes vivants à leur action. La liste des produits de ce type utilisés comme médicament ou comme moyen de diagnostic ou entrant en tant que matériel au contact des tissus (jusqu'y compris les matières plastiques), c'est-à-dire introduits d'une façon ou d'une autre dans l'organisme du malade, est très variée.

Dans la Pharmacopée Française, elle est longue et on y trouve des substances douées d'une intense activité. Citons par exemple :

- Les sérums thérapeutiques et les vaccins (bactériens et viraux).
- Les antibiotiques.
- Les hormones et substances tirées des glandes endocrines, du sang et dérivés (y compris issues de l'homme).
- Certaines drogues végétales douées d'action physiologique spécifique (p. ex. digitale, aconit, etc.).
- Des substances à activité enzymatique.
- Des vitamines et produits assimilés.
- Divers réactifs biologiques (p. ex. toxine de Schick, tuberculines, malléine, etc.).
- Plusieurs substances utilisées à des fins spécifiques, comme matériel (fils à ligatures chirurgicales par ex., ou encore les matières plastiques, seringues, aiguilles stériles, etc.).
- Et même des produits chimiques de synthèse dont la toxicité particulière où l'activité spéciale nécessite l'usage du réactif biologique vivant (comme par exemple le novarsenobenzol, la suramine sodique, etc.).

Remarquons au passage que certains produits, d'origine réellement biologique (comme certains antibiotiques par exemple) peuvent, par la suite, être préparés par synthèse avec une telle pureté qu'ils deviennent dès lors justiciables d'un contrôle uniquement physico-chimique. De ce fait, ils quittent la classe des produits dits biologiques. Notons bien que ceci n'est valable que pour les produits purs, mais ne l'est plus pour des préparations galéniques dans la formule desquelles figure la substance en question. Dans ce cas, la jurisprudence française demande la vérification de l'activité physiologique par le titrage biologique.

Inversement, des substances, comme des produits chimiques de synthèse, qui se rattachent à l'usage particulièrement toxiques, parfois par suite d'impuretés difficilement titrables par voie physico-chimique, deviennent secondairement justiciables de l'essai biologique sur la cellule vivante.

Bien plus, certaines épreuves ayant pour but d'éliminer les produits ou les préparations médicamenteuses présentant divers caractères d'impuretés, exigent l'intervention du réactif animal ou de la cellule vivante, c'est-à-dire sont classées dans le contrôle biologique. Tel est le cas des essais relatifs au pouvoir pyrogène, à la détection des substances histaminiques, à la stérilité, à la vérification d'absence de toxicité anormale (anciennement innocuité) etc. De telles épreuves « biologiques » s'appliquent indifféremment à des produits d'origine biologique ou de matière médicale, ou chimique.

Lorsque l'on parle de contrôle biologiques, il est peut-être préférable d'envisager non pas les produits eux-mêmes, mais les épreuves biologiques

qu'ils subissent. Sur cette base, on trouve dans le Codex français (dernière édition 1965 et premier supplément 1968) plus de 100 substances, drogues ou matériaux divers soumis à un ou plusieurs essais biologiques (environ 112 à 113 produits).

Les contrôles importants qui nous intéressent le plus, sont les suivants :

- a) le contrôle de la stérilité ;
- b) le contrôle du pouvoir pyrogène ;
- c) le contrôle de la présence de substances histaminiques ;
- d) la recherche de toxicité anormale ;
- e) le titrage microbiologique des antibiotiques et des vitamines ;
- f) les titrages antigéniques (contrôle des sérums et vaccins) ;
- g) les titrages d'activité pharmacodynamique spécifique ;
- h) les dosages enzymatiques.

Tous ces contrôles mettent en jeu comme réactif des organismes vivants : microorganismes, animaux, organes isolés, cellules isolées, etc. Tous ont ceci de commun, qu'ils travaillent sur la matière vivante, avec tous les avantages et les inconvénients que cela représente.

Le contrôle biologique est très différent, on le sait, du contrôle physique et chimique qui, lui, obéit plus strictement aux règles de précision et de rigueur mathématiques propres à ces sciences. La plus grande partie des techniques analytiques, physiques et chimiques obéissent à des lois parfaitement connues et bien codifiées. Les mécanismes mis en jeu sont des phénomènes remarquablement saisis, facilement mesurables et qui se rapportent à des unités de mesure unifiées dans le monde entier et qui ne prêtent pas à discussion. Une grande rigueur scientifique préside donc à l'établissement des méthodes mises en oeuvre. Les réactifs, les instruments de mesure peuvent être aisément préparés ou construits. Les premiers sont d'une grande pureté, les seconds sont d'une grande précision dans leur manipulation. Les étalons de mesure ne sont pas discutés. Les résultats doivent être reproductibles facilement et le contrôle de leur validité est aisé.

Il n'est pas de même, on le sait également, avec les titrages ou les essais biologiques parce qu'ils mettent en oeuvre une matière éminemment variable : la *cellule vivante*.

Il est indéniable que l'activité biologique d'une substance doit être évaluée *en fonction* du tissu vivant sur lequel cette substance agit. Il paraît donc logique de mesurer son activité au moyen de la quantité minimale qui produit un certain effet biologique. On peut, par exemple, utiliser soit l'action d'un antibiotique sur une culture bactérienne (par exemple l'action inhibitrice de la Pénicilline sur une culture de *Micrococcus pyogenes*, var. aureus, ou bien son activité inhibitrice sur les échanges gazeux de ce germe),

soit étudier le pouvoir anticoagulant de l'héparine sur du plasma de mouton, ou le pouvoir hémolytique de la toxine de *Clostridium perfringens* (*C. welchii*), soit encore utiliser à des fins analytiques le pouvoir léthal de la Digitale sur le chat, la grenouille ou le cobaye, etc.

Ceci peut paraître simple et logique. En apparence, ces manipulations sont tout-à-fait comparables à une réaction chimique ou à une mesure physique. Hélas, il n'en est rien et nous savons tous que les résultats bruts sont mathématiquement ininterprétables en raison des grandes variations que présentent les échantillons de tissus vivants successivement utilisés dans les essais, et qui ne conduisent à des résultats relativement reproductibles et valables, qu'après l'exécution de très longues séries.

L'expérience a montré depuis longtemps que toute observation biologique, quelle qu'elle soit, portant sur un nombre suffisamment grand d'observations individuelles, ne conduit pas à un résultat identique (aux erreurs d'expérience près), mais décrit une courbe en cloche : c'est la très classique courbe de Gauss. C'est là une différence essentielle avec l'observation d'un phénomène issu d'une science exacte.

Soit à neutraliser une solution acide, avec une solution alcaline N/10 en utilisant une burette micrograduée, le nombre de ml ou de micro-ml utilisés sera toujours le même ou s'inscrira de part et d'autre d'un chiffre donné dans des limites très étroites et très précises, même si le manipulateur recommence le titrage des centaines de fois.

Mais si l'on veut déterminer la sensibilité d'une population animale homogène à l'action d'un produit toxique ou bien doué d'une action antigénique quelconque, le résultat : la mort du sujet par exemple va conduire à des observations s'étalant sur des limites très grandes. Bien sûr, nous aurons quand-même un chiffre valable à la longue. Si les expériences sont assez nombreuses, nous verrons que la majorité des résultats s'accablent dans une zone centrale, pas très groupés, assez suffisamment pour donner l'impression, mais l'impression seulement, que la vraie solution s'y trouve. Toutefois, à côté de cette zone, quantités de valeurs s'éparpillent à droite et à gauche, à des distances plus ou moins grandes, et en nombres de moins en moins élevés. En somme, les observations conduisent à des variétés de résultats dont le nombre est maximal au centre et va en diminuant aux deux extrémités, lesquelles sont souvent très éloignées de ce centre.

Si l'on utilise un nombre suffisant grand d'essais, on arrive à se faire une opinion, car la zone centrale se dessine plus ou moins vite, mais si le nombre de manipulations est insuffisant, quel chiffre convient-il de retenir ? Tout paraît devoir être remis au hasard et à la chance de l'expérimentateur.

La grandeur mesurée dans ce type de dosage biologique est donc d'abord un résultat, une réaction provoquée par une substance complexe, sur un groupe d'êtres vivants ou d'organismes isolés maintenus en survie, et non

sur un *unique* réactif. Puis ensuite, pour minimiser au maximum les variations dans les réponses, le dosage est pratiqué deux fois avec le même réactif vivant, d'abord sur la substance à expertiser, puis sur une substance de référence supposée stable : *l'étalon*. Cet étalon va du reste poser de nombreux problèmes qui seront discutés plus loin.

Les difficultés du contrôle biologique sont telles que l'expérimentateur est parfaitement conscient du fait que les variations dans les réponses obtenues peuvent être considérables d'un laboratoire à l'autre, ou même dans un même laboratoire d'un jour à l'autre. Les titrages s'effectuent donc en comparant, dans la même série d'essais, l'activité du produit inconnu, à celui d'un produit de référence d'activité théoriquement parfaitement définie.

Malgré ces précautions, la variation dans les chiffres obtenus est souvent importante. Il est donc *indispensable* d'avoir une idée de la *précision* avec laquelle le résultat est estimé. Pour cela, on calcule les *limites de confiance* du titre obtenu, c'est-à-dire les limites entre lesquelles le titre véritable possède un pourcentage de chance important de se trouver compris, autrement dit de se trouver exactement au centre de la zone centrale de la courbe de Gauss et non dispersé dans ses extrémités.

Par l'examen des limites de confiance d'un résultat de titrage biologique, on peut décider si la précision obtenue est suffisante ou bien si elle doit être améliorée par un ou plusieurs nouveaux titrages dont les résultats seront combinés avec le premier chiffre obtenu.

Le plan des essais Biologiques obéit à certains impératifs mathématiques afin de permettre leur interprétation statistique, c'est-à-dire l'application des lois du nombre aux résultats obtenus. Nous y reviendrons plus loin. Citons dès maintenant par exemple l'obligation d'observer les règles permettant de minimiser les erreurs expérimentales, d'éliminer les valeurs aberrantes, le remplacement des valeurs absentes. Tous ces points étant nommément désignés dans notre Pharmacopée Française.

Dès les débuts de l'étude de titrages sur la cellule vivante, on s'est heurté à ces difficultés. Le premier, Ehrlich a dû les surmonter dans ses tentatives pour le titrage du sérum antidiphthérique. Ce savant se trouvait en présence d'un système comportant trois facteurs biologiques plus ou moins variables, équation à deux termes connus et une inconnue :

- le Cobaye : élément variable, mais connu
- la toxine diphtérique : élément instable, mais connu
- l'antitoxine diphtérique : élément *stable*, mais inconnu.

Ehrlich partait de deux postulats : en premier lieu l'essai de mesure de l'activité biologique devait se faire *par rapport* aux réactions d'un organisme *vivant* sur lequel la substance possède un effet spécifique. En second

lieu, la définition de l'activité d'un poids donné d'une préparation de base devrait être donnée pour une préparation témoin de ladite substance.

Dans le cas particulier, ce fut la définition de la DmM. et la protection du Cobaye contre la toxine par le sérum antidiphthérique. Ehrlich eut le grand mérite d'introduire un facteur éminemment fixe dans ce système composé d'éléments plus ou moins stables: le facteur temps avec ses fameuses 96 heures.

On sait, qu'exprimée en fonction de la DmM. pour Cobaye, l'unité antitoxine a été définie comme étant la quantité minimale susceptible de neutraliser 100 DmM. de toxine pour un Cobaye d'un poids donné.

Depuis cette époque héroïque, bien des travaux ont été consacrés à ces problèmes des titrages biologiques. Il est maintenant bien connu que la réponse physiologique à une drogue varie avec la quantité de dose active administrée. On sait qu'il existe une relation étroite entre deux données obtenues par la voie expérimentale, c'est-à-dire par la technique: la dose appliquée à l'élément vivant réactif et la réponse biologique. Cette relation est ordinairement représentée par une courbe en S. D'une façon générale, on y distingue trois segments:

a) avec des petites doses: faible augmentation des réponses au fur et à mesure de l'augmentation des doses (réponse dite *lente*).

b) avec des doses moyennes: zone d'activité intense: augmentation brutale du titre des réponses avec l'augmentation des doses (réponse dite en phase d'*expansion intense*).

c) avec des doses fortes: faible augmentation des réponses sous l'effet de l'augmentation des doses (réponse à nouveau *lente*).

Tout cela dépendant, bien entendu, de la qualité, de la « fraîcheur » et de la capacité des récepteurs. L'établissement de cette classique courbe « dose-réponse » est la base même de nombreux titrages biologiques utilisant des voies très différentes et des techniques variées.

Mais pour l'exploitation des résultats, des manipulations mathématiques des données expérimentales sont nécessaires. Pour ce faire, deux points sont à considérer.

1^o La lecture des résultats est facilitée quand on considère une *portion droite* et non une courbe. En réalité, c'est le seul moyen valable d'interpréter les résultats de la courbe en S précédente. La proportionnalité des réponses satisfait alors l'esprit. Or, au centre de la courbe dose-réponse en S, on se trouve dans une portion souvent rectiligne.

2^o Ceci posé, on peut améliorer la situation. Il est possible, par des artifices, de transformer la courbe en S, en droite. Il s'agit d'un changement de coordonnées, par transformation des chiffres en leur logarithme, ce qui modifie leur espacement dans l'échelle. A ce moment-là, on peut même

encore simplifier la lecture, la « courbe » étant caractérisée par une seule donnée : sa pente.

Cette transformation de la courbe sigmoïde en droite peut s'obtenir de différentes façons, proposées par les mathématiciens que l'on peut résumer, comme suit.

Il est classique d'exprimer les résultats de l'essai « dose-réponse » en traçant une courbe, en plaçant en abscisse les doses, et en ordonnée les pourcentages de réponse du réactif vivant. Le résultat en est la courbe en S dite sigmoïde cumulative (intégrale de Laplace). Comme nous l'avons dit, seule la portion moyenne, rectiligne, est satisfaisante et on peut, sans erreurs notables, transposer l'observation pratique en théorie mathématique.

On peut améliorer la réponse en modifiant l'échelle des abscisses. Au lieu d'y porter les doses, on y indique les logarithmes de celles-ci. On dresse donc une courbe avec, en abscisse, les log doses et en ordonnée toujours, les % de réponse. On obtient non pas une sigmoïde complète, mais pour la plus grande partie une droite. On augmente donc considérablement la portion rectiligne, mais il subsiste, pour certains esprits, un gros inconvénient, on ne tient pas suffisamment compte des extrémités courbes de ce qui reste de la sigmoïde initiale.

Une partie des inconvénients de cette transformation a été éliminée par l'utilisation du système des unités « Probits », notation proposée par Bliss à la suite de Gaddum et qui repose sur des considérations mathématiques bien connues. En gros, cela consiste à remplacer les % par des probits en utilisant une formule que les statisticiens estiment simple :

$$U \text{ Probit} = \frac{M - X}{\sigma}$$

\overline{M} = moyenne des log doses utilisées dans l'essai ;

\overline{X} = log de la dose correspondant au % réponse donné ;

σ = déviation standard.

Par exemple, 10 % devient 3,72 exprimés en probits, 30 % devient 4,48 — 50 %, 5,00 — 70 %, 5,52 — 90 %, 6,28 etc. Grâce à cet artifice, on obtient pratiquement une droite de bout en bout de la « courbe ».

Autrement dit, il existe trois moyens de traduire les résultats d'un essai « dose-réponse » :

a) en abscisse on inscrit les doses, en ordonnée les % de réponse = résultat S ;

b) en abscisse on inscrit les log doses, en ordonnée les % de réponse = une presque droite ;

c) en abscisse on inscrit les log doses, en ordonnée les probits = une droite.

Ceci se traduit par de gros avantages techniques. Dans le premier cas *a)*, il convient d'obtenir au minimum 5 à 6 points d'où de nombreux essais. Dans les autres cas, théoriquement 2 points suffisent, mais on en préfère souvent 3.

Enfin, le tracé d'une droite offre un avantage considérable pour la confrontation d'une substance avec un étalon. L'activité d'un produit inconnu est généralement calculée en pourcentage de celle de l'étalon, par le rapport de l'ensemble des deux séries de résultats confrontées. Quand on présume à l'avance l'ordre de grandeur de la substance inconnue, ce qui est souvent le cas lors des contrôles réglementaires de l'État, on opère dans des zones voisines pour les deux titrages (X et étalon); on obtient facilement, lorsque les opérations sont correctement menées, deux droites parallèles. L'activité du produit à expertiser peut être également obtenue par le calcul de l'antilogarithme de la différence de réponse entre les log. de la dose inconnue et ceux de l'étalon. (On obtient la même réponse qu'en travaillant sur les pourcentages, puisqu'avec le calcul logarithmique, un quotient est une différence de log). Dès lors, on se libère des réponses en %, et puisque l'activité du corps à titrer est l'antilog. de la différence entre les log. des résultats de l'étalon et du produit inconnu, les mathématiciens nous expliquent que l'activité de ce dernier peut être calculée par la distance *horizontale* entre ces droites qui, encore une fois, doivent être *parallèles*.

La mise en place d'un titrage biologique nécessite donc la mise en oeuvre d'un véritable plan de travail, prévu à l'avance. Prenons comme exemple celui proposé par la Pharmacopée Française 1965, 8^e édition, pages 1625 à 1642.

Plan général d'un essai biologique.

- 1) Choisir le réactif animal (ou protiste) adéquat, et apprécier le nombre en fonction du calcul qui sera retenu et de la technique envisagée.
- 2) Recueillir les résultats.
- 3) Calculer la moyenne des résultats et, surtout, de ses limites de confiance. Calcul de la précision du dosage par l'estimation de la variance de l'erreur expérimentale.
- 4) Placer les essais dans le cadre de l'interprétation des résultats, dans le but :
 - a) de minimiser l'erreur expérimentale ;
 - b) d'éliminer les valeurs aberrantes, après avoir vérifié par le calcul qu'elles peuvent être rejetées ;
 - c) de remplacer les valeurs absentes (p. ex. en cas d'accidents ou de mort d'un sujet-réactif).

On peut donner ici quelques exemples d'essais biologiques, d'après le Codex français.

A. — Détermination d'un seuil d'activité.

Il est basé sur la mise en évidence de la dose limite provoquant une réponse donnée. Par exemple : essai de la *Digitale* (Feuille, Poudre, Teinture). On détermine la dose qui, par perfusion veineuse, provoque l'arrêt du cœur d'un animal en un temps donné.

Dans certains cas, on peut éliminer l'erreur due aux variations d'un animal à l'autre, comme dans les essais de curarisant chez le Lapin. Chaque animal peut recevoir successivement, à un intervalle approprié, l'étalon et la substance à expertiser.

Dans tout les cas, on calcule la moyenne des résultats selon les formules mathématiques exposées dans la Pharmacopée. *Idem* pour les limites de confiance. L'activité relative de l'échantillon par rapport à l'étalon est donnée par l'antilog de cette moyenne ou, si l'on veut l'exprimer en unités internationales, par la relation: (antilog Moyenne) \times R, R étant l'activité en unités attribuée par hypothèse à l'échantillon inconnu au moment de sa dilution.

B. — Dosage avec l'aide d'une courbe étalon.

Les réponses peuvent être de deux types : elles peuvent être « mesurables » donc quantitatives (diamètre d'une inhibition d'antibiotique sur une pousse bactérienne en gélose p. ex.), ou du type « tout ou rien » (mort d'un animal par exemple), donc qualitative.

I. Réponse mesurable. — On pratique un certain nombre d'essais, en nombre suffisant et on recueille les réponses en fonction des doses utilisées. On opère de même façon avec une substance de référence connue (étalon). On peut estimer le titre de la substance X de deux façons.

a) *par interpolation* : on trace la courbe dose-réponse dont nous parlions plus haut. Si l'on porte en abscisse les doses et en ordonnée les réponses, on obtient la courbe en S. Si l'on substitue le log. des doses aux doses elles-mêmes, on remplace la plus grande partie de la courbe par une droite, comme nous l'avons dit plus haut. En traçant judicieusement ces courbes ou droites, en particulier en portant les résultats obtenus avec l'étalon (doses ou log de doses et moyennes calculées des réponses correspondantes), on peut lire par interpolation quelle est la quantité d'étalon qui donnerait une réponse analogue à celle obtenue pour chaque dose de l'échantillon. On calcule, suivant les méthodes indiquées à la Pharmacopée, selon que l'on part des résultats obtenus avec la sigmoïde (doses) ou la droite (log doses), l'activité du produit expertisé.

b) *à l'aide de l'essai factoriel* : le principe de base est le travail fait sur les deux segments de droites sensiblement parallèles, caractérisés par une pente b commune, dont nous avons parlé plus haut. L'activité relative en log de l'échantillon à analyser étant figuré par la distance horizontale

entre les deux segments de droite. Dans l'essai factoriel, la gamme des doses, choisie bien entendu dans la portion linéaire de la courbe, doit être répartie selon une progression géométrique (1-2-4-8 par ex.). Selon les cas, on peut utiliser pour l'étalon et chaque échantillon deux ou trois doses (par ex. pour le titrage des antibiotiques : trois, ou de la vitamine A : deux) ou quatre doses (p. ex. essai des hormones gonadotropes). Des variantes peuvent être utilisées :

1 : *dosage classique*, en comparant l'échantillon X à l'étalon. Avant de calculer l'activité du produit, il faut s'assurer de la validité du dosage : trois conditions sont précisées p. 1635 de la Pharmacopée Française. Nous les analyserons au chapitre I (voir plus loin).

2 : *essai factoriel incomplet*, qui se produit si l'hypothèse faite sur l'activité de la substance à doser est trop éloignée de réalité, ce qui fait qu'une des doses extrêmes choisies donne une réponse située nettement hors de la gamme choisie pour l'étalon. La Pharmacopée indique le moyen d'utiliser quand même le dosage.

3 : *dosage de plusieurs échantillons par rapport à un seul étalon*. La Pharmacopée Française indique les calculs à effectuer pour accroître la précision des titrages.

4 : *essai croisé*. Au cours de certains titrages où le même animal peut être utilisé plusieurs fois, la méthode de l'essai croisé permet d'améliorer la précision du dosage en éliminant les variations d'un sujet à l'autre de l'erreur expérimentale (tel est le cas du titrage de l'insuline).

II. *Réponse du type « Tout ou rien »*. C'est le cas où le résultat de l'essai n'est plus quantitatif mais qualitatif (p. ex. mort ou survie). La même dose administrée à un groupe d'animaux entraîne un certain nombre de réponses positives que l'on peut exprimer en pourcentage. C'est dans ce cas que la Pharmacopée Française recommande l'utilisation, en ordonnée, non pas des % de réponse, mais des unités *Probits*. On peut également se servir d'une autre transformation : la transformation *angulaire*, laquelle donne, pour des réponses comprises entre 10 et 90 %, une courbe log dose-réponse pratiquement superposable à la courbe log dose-Probit. Par exemple, pour ce type de réponse « Tout ou rien », un nombre constant d'animaux reçoit l'une des doses espacées en progression géométrique, de l'étalon ou de l'échantillon X, selon un arrangement factoriel (essais dits à 2 doses, ou 3 doses, ou 4 doses). La gamme est choisie de façon à couvrir un % de réponses positives compris entre 10 et 90 %. Le détail des calculs est donné à la Pharmacopée.

C. — *Combinaison de plusieurs titrages indépendants.*

C'est le cas pour lequel on pratique plusieurs déterminations indépendantes du titre probable à l'aide de dosages séparés, le même jour ou plu-

sieurs jours de suite, de façon à augmenter la précision du titrage. On obtient, de ce fait, plusieurs valeurs dont on a, bien sûr, calculé les limites de confiance. On doit combiner ces résultats, en tenant compte d'un facteur dit de *pondération*. La Pharmacopée donne tous les détails nécessaires pour de tels calculs.

D. — *Limites d'erreur.*

La Pharmacopée Française insiste à diverses reprises sur l'importance de la vérification de la valeur des résultats, en procédant aux calculs de la confiance que l'on peut leur accorder (calcul des limites de confiance, estimation des limites d'erreur). Un exemple de ces derniers peut être fourni par la lecture de la fin de la monographie « Vitamine A » où il est dit que les limites d'erreur de chaque titrage sont interprétées d'après les résultats de chaque essai. Si l'estimation de la pente de la courbe exprimant la relation entre le log. de la dose et la réponse ne dépasse pas huit fois son erreur type, il faut calculer les limites de sécurité.

Problème de étalons

Bien entendu, ces essais Biologiques sont dominés par le problème des *étalons*. Tous ces dosages sont effectués, en effet, par comparaison des résultats à celui obtenu avec un produit de référence d'activité *parfaitement définie* et, bien entendu, *stable* non seulement dans le temps (*conservation*), mais dans l'espace (les résultats doivent être superposables quels que soient le pays, la région, ou la saison à laquelle est exécuté le dosage).

Comme le disait, il y a quelques années, un des experts les plus écoutés de l'O.M.S. (A. A. MILES, *Bull. O.M.S.* 1949, 2, 211) :

« un étalon national ou international est une partie essentielle des définitions officielles des pharmacopées et des règlements gouvernementaux qui font loi ou qui servent de base pour les actions en justice et pour les grandes transactions commerciales. Il faut donc se garder avec soin de toute inexactitude évitable et de toute confusion pouvant provenir d'un malentendu dans l'emploi d'un étalon ».

Or, ces étalons doivent être préparés et conservés avec beaucoup de soin. En France c'est, comme l'indique la Pharmacopée dans bon nombre de ses articles, le Laboratoire National de la Santé Publique qui conserve et dispense les étalons (ou réactifs de référence). *Par exemple* : ACTH (cf. p. 67), préparation étalon de lobe postérieur d'hypophyse (cf. p. 68), anatoxines diphtérique (cf. p. 116), staphylococcique (cf. p. 119), tétanique (cf. p. 120), Bacitracine (cf. p. 157), Benzylpénicillines (cf. p. 179), Chymotrypsine (p. 296), Poudre de Digitale (cf. p. 375 et p. 869), Erythromycine (cf. p. 406), *sérums antiplasma animal* (cf. p. 482), *Solution de thrombine* (cf. p. 483), Sulfate de Framycétine étalon en base étalon (cf. p. 493), Gona-

dotrophines (cf. p. 543), Hyaluronidase (cf. p. 589), Insuline (cf. p. 602), Sulfate de Néomycine (cf. p. 721), Nystatine (cf. p. 746), Pénicilline G (cf. p. 802), Phénoxyéthylpénicilline (cf. p. 803), *anti-sérums animaux* (cf. p. 824 et 969), *anti-sérum humain* (cf. p. 824 et 969), *thrombase* (cf. p. 825), posthypophyse (cf. p. 876), sérums d'animaux hyperimmunisés (cf. p. 972), sérum antirabique (cf. p. 981), étalon oxytocicque (cf. p. 1072), Sulfate de Streptomycine exprimé en streptomycine base (cf. p. 1107), Sulfate de DHS (cf. p. 1111), Suspension d'étalon I.P.Z. (insuline) p. 1160, Tuberculine (cf. p. 1245), Tyrothricine (cf. p. 1253). Ces références correspondent toutes à des notes bas de page. Les substances en italique sont des réactifs.

En ce qui concerne les étalons pour les antibiotiques, le Codex 1965 donne quelques précisions p. 1611. Il expose que :

« pour un certain nombre d'antibiotiques, il existe un étalon international, établi sous l'égide de l'O.M.S. et servant de référence pour les étalons nationaux ou étalon de travail. Le Laboratoire National de la Santé Publique fournit des étalons de travail établis par rapport aux normes des étalons internationaux ou obtenus par étalonnage des préparations qui lui sont confiées par rapport à ces standards ».

Suit la liste des étalons internationaux de 1962. Pour plus de détails, se reporter au chapitre IV de ce mémoire : *Titrage microbiologique des antibiotiques*.

Cette question des antibiotiques pose un certain nombre de problèmes qui doivent être résolus si l'on veut que les contrôles des produits biologiques soient valables et acceptés par tous les usagers. Nous aurons l'occasion de revenir sur ces questions plus loin, mais d'ores et déjà nous voudrions souligner divers points cruciaux.

Le bon usage des étalons exige :

a) que tout le monde (fabricant, contrôleurs, Pharmacopée) soit bien d'accord sur le principe et les modalités technologiques du titrage adopté pour un produit et un étalon donnés.

b) que l'étalon soit bien adapté à une méthode de titrage facilement reproductible.

c) qu'il soit d'une bonne conservation, non discutée.

d) qu'il ne soit adopté qu'après vérification pour chaque lot fabriqué, après un titrage en commun dont les résultats seront interprétés avec calculs statistiques valables.

e) que l'étalon soit contrôlé périodiquement au cours de sa conservation.

A l'étalon doivent être joints les problèmes posés par le concept de l'Unité biologique d'activité. Mais c'est là une question qui dépasse le cadre de ce travail. Il faudrait également discuter les notions de pureté, ou d'hétérogénéité des substances choisies comme étalon. Nous y reviendrons plus loin.

Problèmes réglementaire et administratif

Enfin, ces contrôles biologiques posent également des problèmes réglementaires et administratifs. Beaucoup ne lui sont pas propres et s'étendent au contrôle des médicaments pris dans leur ensemble.

En ce qui concerne les produits soumis aux essais dits biologiques, on ne peut que souligner les faits impliquant l'intérêt particulier que doivent y porter les Services officiels de contrôles :

a) Le maniement de certains d'entre-eux s'avère très délicat et a un profond retentissement en matière d'épidémiologie. Ceci en particulier pour les sérums et les vaccins. Bien plus, certains d'entre-eux sont d'un emploi légal et obligatoire.

b) L'aspect parfois collectif de leur fabrication risque d'augmenter considérablement le danger de leur emploi (nocivité : cf. les accidents U.S.A. des premiers vaccins antipoliomyélitiques — ou inefficacité : cf. les dangers après une campagne de vaccination).

c) Le fait que les divers contrôles préalables à l'occasion d'un produit nouveau, ne permettent pas une estimation définitive du produit biologique. En effet, compte-tenu quelquefois de l'absence d'une base scientifique directement évaluable, les méthodes de titrage sont parfois fluctantes avec l'augmentation de nos connaissances scientifiques.

Les impératifs de la Santé Publique font que le support administratif nécessaire pour assurer la surveillance d'une bonne utilisation des normes de la Pharmacopée doit comprendre (et c'est en particulier le cas en France) :

1. — une Direction administrative et d'exécution ;
2. — des Services d'Inspection ;
3. — des Services scientifiques et techniques de Laboratoire.

Ce dernier organisme s'appelle, en France, le Laboratoire National de la Santé Publique. Il dispose d'un personnel hautement qualifié, d'un équipement adapté à l'évolution des techniques, d'une documentation constamment mise à jour. De plus, ce laboratoire se maintient en liaison avec les organismes homologues des autres pays. La présence à Rome de l'auteur de cet article en est une confirmation, en ce moment.

Enfin, le Laboratoire National est en relation constante avec les organismes officiels d'enseignement universitaire et technique supérieur. Certains de ses membres du personnel scientifique participent même de très près à l'enseignement (cours magistraux, exposés techniques, éducation de stagiaires techniciens, etc.).

À l'occasion des contrôles effectués sur les préparations biologiques prélevées par les Services d'Inspection, les directeurs du Laboratoire National procèdent à un examen critique des méthodes d'analyse préconisées par la

Pharmacopée ou utilisées par les industriels pour les produits biologiques nouveaux et présentées à l'occasion de demandes d'autorisation de mise sur le marché des médicaments spécialisés (visa) et non décrits au Codex (cf. plus loin).

Enfin, le Laboratoire National exerce une activité de recherche scientifique dans tous les domaines concernant le contrôle et la qualité des produits dits biologiques. Règlementairement, ce laboratoire doit collaborer à la spécification des normes et des techniques d'essais envisagées pour la Pharmacopée Française.

CHAPITRE I.

LA LEGISLATION EN FRANCE

La première allusion faite en France, aux produits d'origine bactérienne, figure dans la loi de base sur l'hygiène publique en 1902 et concerne la *vaccine* qui doit être l'objet d'un contrôle d'Etat.

C'est ensuite le Codex de 1908 (5^e édition) (qui succède à celui de 1884), lequel présente, pour la première fois en France, des monographies consacrées aux produits d'origine biologique : sérums, vaccins et produits opothérapiques. Les Pharmacopées de 1937 (6^e édition), 1949 (7^e édition) et enfin 1965 (8^e édition) renferment de nombreux articles et monographies consacrées à ces substances. Pour l'édition de 1965, il convient de noter, ainsi qu'il est dit dans sa Préface (p. 19) : « ... après les produits chimiques, ce sont les produits d'origine biologique qui apportent le plus grand nombre de nouveautés... ». La Pharmacopée Française renferme, en effet, des monographies sur les matières suivantes : Matière médicale - Produits galéniques - Produits chimiques - Produits biologiques.

Diverses difficultés ayant entraîné l'impossibilité de terminer, avant l'édition du volume de 1965, quelques-unes des monographies, la Pharmacopée Française indique, dès ses premières pages, qu'un certain nombre d'entre-elles seront réservées. De ce fait, on peut dresser trois listes relatives aux produits d'origine biologique de la 8^e édition. L'une a trait aux monographies *nouvelles* par rapport à l'édition précédente, l'autre aux monographies à *l'étude*, outre la liste totale.

Monographies totales dans lesquelles figurent ou bien des produits d'origine biologique, ou bien pour qui sont imposés des essais biologiques tels que nous les avons définis dans l'introduction : 112 ou 113 produits (dont le détail sera donné dans les chapitres suivants).

Monographies nouvelles (par rapport au Codex 1949). Une vingtaine de produits type Biologique, plus des matériaux divers, parmi lesquels on note : Digitoxine - Auto-vaccins - Anatoxines diverses - Fils pour ligatures chirurgicales - Sérums divers - Tuberculine purifiée - Vaccins divers - Vita-

mines diverses - Gonadotrophines diverses - Héparine - Hyaluronidase - Digitale - Huile de foie de morue - Matière plastique - Aiguilles et seringues stériles - Bouchons pour préparations injectables, etc.

Monographies à l'étude : des produits biologiques proprement dits (extrait de bile, poudre d'organes divers), des vaccins (vaccins viraux en particulier), des enzymes (diastase, papaine, pancréatine, pepsine, etc.).

De plus, dans les annexes diverses sont étudiées de nombreuses questions intéressant les contrôles dits biologiques, notamment les suivants :

Méthodes générales d'analyses.

Partie E. — *Méthodes statistiques* : Interprétation statistique des essais biologiques, p. 1625 à 1642.

Partie D. — *Méthodes biologiques* :

- Dosage bactériologique des antibiotiques, p. 1601 à 1615.
- Recherche et essai des substances pyrogènes, p. 1615 à 1618.
- Essai de stérilité des préparations injectables, p. 1618 à 1622.
- Titrage biologique des substances histaminiques, p. 1622 à 1624.

Divers.

- Etalons d'antibiotiques, p. 1611.
- Interprétation des résultats d'analyses bactériologiques des eaux, p. 1788.
- Tables pour l'interprétation statistique des essais biologiques, p. 1809 à 1815 (annexe 6).

En plusieurs endroits, des conseils et des mises en garde sur les pièges que peuvent receler les essais biologiques sont donnés. Nous ne pouvons les donner tous. Ils sont du reste très classiques et imprégnés du plus grand bon sens. Nous nous contenterons de signaler ce qui est écrit p. 542, à l'article « Gonadotrophines » :

« ... les dosages (biologiques) peuvent être influencés par de nombreux facteurs : race des animaux, conditions d'entretien, alimentation ; en particulier, la constance du régime, la température ambiante, la saison, l'éclairage sont autant d'éléments qui peuvent faire varier la réactivité des animaux... (les titrages) doivent être effectués sur un nombre important d'animaux et toujours comparés à l'étalon international, soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire d'un étalon secondaire contrôlé ».

Enfin, la Pharmacopée Française invite les expérimentateurs à utiliser largement l'interprétation statistique des essais biologiques, c'est-à-dire de recourir, pour exprimer la validité de tels titrages, à ce que nous avons exposé dans la partie introductive de ce travail.

Le calcul statistique est indispensable pour apprécier les résultats des mesures faites sur un élément vivant et obvier à son incertitude. Seule la multiplication des essais peut lever le doute sur la valeur de ses données.

Seule l'interprétation mathématique, basée sur les éléments que nous avons rappelés plus haut, peut conduire à des chiffres valables, précisant les limites de la confiance que l'on peut leur accorder, indiquant si la précision obtenue est suffisante, si les erreurs expérimentales sont minimales et peuvent donc être acceptées, si les essais effectués peuvent être considérés comme valides, etc.

L'interprétation statistique des essais biologiques peut se faire en gros, de deux façons : soit en accumulant les données expérimentales et en faisant exploiter celles-ci par des *ordinateurs*, soit en gardant une échelle plus « humaine » et en travaillant avec des gammes de doses telles que les calculs puissent être simplifiés et effectués de façon relativement facile par un calculateur moyen et une machine à calculer manuelle.

La Pharmacopée Française a, dans sa 8^e édition, Codex 1965, adopté cette seconde solution. Dans sa partie, méthodes générales d'analyses — Méthodes statistiques — déjà citée (cf. plus haut), on peut lire, en effet, p. 1625 :

« Outre les méthodes de calcul classiques, parfois assez laborieuses, qui figurent dans cet article, des tables ont été établies, qui permettent, à l'aide de formules simplifiées, d'obtenir... (ces calculs)... rapidement, mais avec une approximation suffisante ».

Effectivement, entre les pages 1625 et 1642, plus de 33 formules sont données toutes faites et sept tables pour l'interprétation statistique des essais biologiques sont données de la page 1809 à la page 1815.

TABLE I. — Valeur de t et t^2 et de x^2 .

Les explications pour les valeurs t figurant pages 1627 et 1631 (15^e ligne) notamment, t^2 à la page 1641 et x^2 p. 1640.

TABLE II. — Coefficients Q et Q' pour le rejet d'une observation aberrante.

TABLE III. — Coefficients pour essais factoriels.

TABLE IV. — Valeur de t_1 pour le test de validité des essais.

TABLE V. — Valeur des coefficients c , c' , et K .

Les explications pour les valeurs c se trouvent p. 1636 (16^e ligne), c' à la page 1637, et K à la page 1638.

TABLE VI. — Dosage en essai croisé (explications voir p. 1638).

TABLE VII. — Transformation angulaire d'un pourcentage en degré (explications voir p. 1640).

Les principes des essais biologiques de la Pharmacopée Française sont des plus classiques et sont, bien sur, semblables à ce qui a été exposé dans la partie introductive de ce travail.

C'est ainsi qu'on peut lire p. 1627 du Codex 1965 :

« Les essais biologiques peuvent être divisés en deux catégories :

a) On détermine, chez deux groupes homogènes d'animaux, la dose limite d'échantillon et d'étalon provoquant une réponse fixée : c'est la recherche d'un seuil d'activité.

b) On administre, à des groupes d'animaux, un certain nombre de doses fixes d'étalon ou d'échantillon et on enregistre la réponse ; celle-ci peut être une grandeur mesurable (augmentation de taille ou de poids d'un organe ou d'un animal, modification de concentration d'une substance dans le sang, opacité d'une culture microbienne, etc...) ou, au contraire, on peut avoir une réponse du type « tout ou rien » (l'animal meurt ou survit) ; on calcule alors, pour chaque dose, le pourcentage d'animaux ayant donné une réponse positive. Dans les deux cas, on pourra tracer une courbe étalon qui servira à apprécier l'activité de l'échantillon ».

La Pharmacopée donne les formules de calcul pour :

— Calcul de la moyenne des résultats, de ses limites de confiance, du nombre de degrés de liberté, de la variance s^2 d'un résultat (deux formules pour s^2 , l'une simplifiée, l'autre accessible seulement si l'on dispose d'une table de carrés et d'une machine à calculer), de l'écart-type. Les limites de confiance de la moyenne sont obtenues en fonction du nombre de degrés de liberté utilisés dans le calcul de s^2 et du « seuil de probabilité » choisi, c'est-à-dire du pourcentage de chances que l'on se fixe, en générale 95 %.

Les formules détaillées pour ce groupe de calculs sont données p. 1626 et 1627, nous y renvoyons le lecteur.

— Les formules mathématiques concernant l'élimination des valeurs aberrantes et le remplacement d'une réponse absente, sont donnés p. 1623 et 1629.

— La détermination d'un seuil d'activité classique conduit à l'utilisation de formules exposées p. 1631 (calcul des variances, des limites de confiance), p. 1632 (les degrés de liberté, limites de confiances) et p. 1630 (activité relative).

— Les dosages avec construction de courbe étalon sont l'objet de diverses formules :

a) Précision du dosage par estimation du titre par interpolation (réponse-dose) et précision du dosage (variance de l'erreur expérimentale) p. 1633, limite de confiance p. 1634.

b) Essai factoriel (réponse log dose), où la Pharmacopée précise à la page 1635 que :

« Avant de calculer l'activité de l'échantillon, on peut s'assurer de la validité du titrage. Pour qu'un dosage soit *valide*, il faut :

— que l'hypothèse faite au départ sur l'activité de l'échantillon soit assez voisine de la réalité :

— que les droites étalon et échantillon soient parallèles, aux erreurs expérimentales près :

— que la relation logarithme dose-réponse soit bien linéaire, aussi bien pour l'étalon que pour l'échantillon ».

Les formules de calcul sont données p. 1636 (validité du titrage, précision du titrage, limite de confiance), p. 1637 (précision du titre). Les formules relatives aux essais incomplets (p. 1637), au dosage de plusieurs échantillons par rapport à un étalon (p. 1638), essai croisé (p. 1639) sont également susceptibles d'intéresser le lecteur.

— Les dosages relatifs aux réponses « tout ou rien » sont ceux qui nécessitent pratiquement le recours à l'échelle Probit (Probits - log. doses). A ce propos, la Pharmacopée Française s'exprime en ces termes :

« Les probits présentent cependant un inconvénient en ce sens que la variance, au lieu de pouvoir être considérée comme constante quelle que soit la dose, comme dans les essais décrits précédemment, est fonction de la dose ; elle est minimale pour un probit égal à 5 (soit une proportion de 50 %) et croît quand la proportion de réagissants tend vers 0 ou 100 p. 100. Il est donc nécessaire d'ajuster la variance des réponses à chaque dose par un coefficient de pondération, ce qui alourdit considérablement les calculs ».

Et la Pharmacopée 1965 de proposer une autre transformation : celle dite *angulaire* qui a, outre l'avantage entre 10 et 90 % de conduire à une courbe exactement superposable à la précédente, celui d'avoir une variance constante quelle que soit la réponse « ce qui permet de l'utiliser directement dans des essais factoriels », analogues à ceux décrits plus haut.

Les formules de calcul sont données p. 1640 (validité du titrage), p. 1641 (limites de confiance).

— Les dosages qui sont des combinaisons de plusieurs titrages indépendants, conduisent à l'utilisation de formules complexes qui sont indiquées p. 1641 (coefficient de pondération), et p. 1642 (homogénéité des moyennes des résultats divers — limites de confiance approchées — variances — résultats moyens finals).

Ces nombreuses formules sont désormais indispensables à connaître, en raison de leur importance pour l'interprétation des essais biologiques sous toutes leurs formes.

Enfin, la législation française (Pharmacopée 1965 - Supplément 1968) impose certaines normes, notamment en ce qui concerne la conservation et l'étiquetage. Ceci s'applique en particulier à divers produits biologiques. C'est ainsi que pour les sérums et vaccins, certains produits d'origine sanguine, les gamma-globulines, diverses préparations hormonales (ACTH, insuline, etc.), des dispositions spéciales prescrivent leur conservation au frais ou à basse température (réfrigérés ou congelés).

Les normes relatives aux indications générales de température sont précisées dans le supplément 1968 d'après ce qui a été adopté par la Commission Européenne de Pharmacopée. C'est même là le premier texte « européen » inséré dans le Codex Français.

Indications figurant à la Pharmacopée.

	Températures correspondantes (°C)
Congelé au congélateur	- 15° à 0°
Réfrigéré ou au réfrigérateur	0° à + 6°
Au frais	+ 6° à + 15°
Température ambiante.	+ 15° à + 25°

De plus, notre Pharmacopée Française exige, pour divers produits « Biologiques », l'apposition sur le conditionnement de la date limite d'utilisation.

Enfin, des règles d'étiquetage sont précisées pour certains produits, notamment pour des substances d'origine biologique diverses telles que l'insuline, l'héparine, les gammaglobulines, la sérum albumine humaine, etc. Nous renvoyons le lecteur aux monographies considérées.

Mais, de nombreux produits biologiques sont justiciables de la législation française sur les spécialités pharmaceutiques. Le principe de celle-ci est de soumettre à une autorisation spéciale ces médicaments. Diverses lois et règlements ont institué la procédure d'abord dite du visa, plus autorisation de débit, puis modifiée par celle dit d'autorisation de mise sur le marché. Nous ne pouvons nous appesantir sur tous ces points. Le lecteur consultera avec fruit la Loi du 6 Août 1953, les ordonnances du 4 Février 1960 et la législation nouvelle de 1959-1960 ; celle de 1965 et les nombreux articles du Code de la Santé s'y rapportant.

D'après cette réglementation, les fabricants de ces spécialités, même si elles renferment ou sont uniquement constituées de produits d'origine biologique, doivent soumettre à l'administration, en vue de l'autorisation de fabriquer et de distribuer leur produit, un dossier soumis à une Commission spéciale, dite du « Visa », qui comporte essentiellement :

1) Une demande assortie de renseignements généraux : formule détaillée et centésimale, y compris tous les excipients, forme pharmaceutique, forme de présentation au malade (volume, contenance), indications thérapeutiques, posologie, date de péremption, adresse des locaux de fabrication, de contrôle et de conditionnement.

2) Indications techniques : fabrication, contrôles de chacune des matières premières et de chacun des excipients et produits adjuvants, contrôle du produit terminé. S'il s'agit de produits d'origine microbienne ou autres microorganismes, le fabricant indiquera l'origine des souches utilisées.

3) Expertises provenant d'un collège triple d'experts agréés par le Ministre des Affaires Sociales (Santé Publique) (Experts analystes, pharmaco-toxicologues, cliniciens) et donnant l'assurance que :

Expertise analytique : les analyses présentées par le fabricant (Physiques, Chimiques ou Biologiques) sont satisfaisantes et reproductibles.

Expertise toxico-pharmacologique : le produit (ses matières premières, comme le produit fini) ne présente d'une part aucune toxicité anormale dans ses conditions normales d'emploi, donc ne peut porter aucun préjudice aux malades et, d'autre part, offre bien les caractères pharmacodynamiques présentés par son promoteur.

Expertise clinique : le médecin expert doit, par un nombre suffisant d'observations *détaillées* sur le malade, démontrer l'intérêt thérapeutique de la spécialité, sa bonne tolérance locale et générale, préciser le cas échéant les contre-indications et confirmer les indications thérapeutiques proposées par le fabricant.

A la suite de l'examen de ce dossier, si des conclusions favorables sont formulées par la Commission compétente, une inspection sur place par l'inspection pharmaceutique procède à la vérification des faits avancés par le fabricant en ce qui concerne la fabrication du produit et son contrôle (matières premières et produit fini). Des prélèvements sont effectués et adressés au Laboratoire National de la Santé Publique pour vérifications analytiques, voire toxicologiques. S'il s'agit d'un produit d'origine biologique, des prélèvements de souches peuvent être effectués.

Dans ses exigences au point de vue contrôle, la Commission du Visa peut, même en ce qui concerne des produits biologiques inscrits à la Pharmacopée Française, être plus exigeante que celle-ci. Par exemple, pour des titrages antigéniques ou des titrages d'antibiotiques, elle peut demander au fabricant un renforcement des contrôles, ou même une modification. Pour les antibiotiques notamment, elle peut exiger, pour le produit fini, qu'un contrôle physico-chimique soit accompagné d'un titrage microbiologique, même si le Codex ne l'indique pas.

CHAPITRE II.

CONTROLES DE ROUTINE COMMUNS A TOUS LES PRODUITS BIOLOGIQUES

La Pharmacopée Française (1965 8^e édition) et son premier supplément 1968, prescrivent un certain nombre de contrôles qui sont communs à divers produits biologiques. Nous examinerons successivement : le *contrôle de stérilité*, la vérification de l'absence de *pouvoir pyrogène*, celle d'une tolérance en substances douces du *pouvoir histaminique*, et la recherche d'une *toxicité anormale*.

A. — *Essai de stérilité des préparations injectables.*

Cette vérification, appelée plus simplement contrôle de stérilité, est décrite de la page 1618 à la page 1622. Elle est prescrite non seulement pour toutes les préparations injectables (d'où son nom officiel), mais aussi

pour un certain nombre d'autres substances, préparations diverses, ou même des objets de pansements et assimilés ou encore certains matériaux.

Le Codex précise :

« L'essai de stérilité a pour but de déceler les contaminations par micro-organismes pouvant souiller les solutés injectables et les préparations ayant été soumis à une stérilisation ou préparés aseptiquement. En raison de la diversité des moyens de stérilisation et de la nature des préparations examinées, ainsi que de l'activité bactériostatique de certaines substances, les essais décrits sont adaptés aux cas particuliers et d'autres techniques, notamment celles des membranes filtrantes, peuvent être utilisées ».

Le Codex français décrit successivement :

I. *Les Milieux de culture.* — Il est précisé, bien entendu, qu'il s'agit de milieux dont on doit vérifier les qualités nutritives. Les pages 1618, 1619 et 1620, donnent quelques formules de milieux successivement pour les recherches des *germes aérobies* (Bouillon peptoné salé, *idem* mais additionné d'un extrait hydrosoluble de levure autolysée, Bouillon peptoné salé, glucosé à 2 ‰, et milieu solidifié à la gélose), des *germes anaérobies* (Milieu viande-foie glucosé, liquide ou solidifié, Milieu gélifié, nitraté et glucosé), pour celles mixtes des *germes aérobies-anaérobies* (Milieux réducteurs à l'acide thioglycolique ou à l'hydrosulfite de sodium) et, enfin, des champignons microscopiques : moisissures et levures (milieu liquide et milieux solidifiés).

II. *Le mode opératoire*, en séparant le cas des suspensions, solutés aqueux, ou poudres, tous étant répartis sous leur forme pharmaceutique, et le cas des solutés huileux. La Pharmacopée décrit tour à tour les quantités à prélever en volume puis par lot. Il est précisé que le prélèvement doit être représentatif du lot (3 unités par lot de 100 ; au-delà, on prélève une unité par fraction de 50, avec un maximum de 10 unités pour les lots importants). Les cultures sont portées à + 37° C (le cas échéant à des températures inférieures pour des produits ayant été au cours de leur préparation, ou étant à base de matières premières cryophiles, portés un temps plus ou moins long à basse température). Les ensemencements sont conservés *au moins* 7 jours à l'étuve. Ce qui sous-entend que le Contrôleur d'Etat peut vérifier ces essais pendant plus de 7 jours, dans le but de rechercher des germes ayant survécu à une stérilisation mal conduite ou à l'attaque d'antiseptiques insuffisants. Enfin, il est donné quelques détails, en cas de doute des résultats d'un premier contrôle et de la répétition des essais.

Le lecteur qui désire obtenir des détails complémentaires pourra se reporter au texte officiel dont nous avons donné ci-dessus la référence.

Enfin, des indications particulières concernant le contrôle de la stérilité de certains matériaux sont données p. 124 du supplément 1968. Nous y reviendrons plus loin.

Substances, matériel et produits divers soumis à ce contrôle de stérilité.

On peut dresser la liste suivante :

- Le cinq anatoxines de la 8^e édition du Codex.
- L'antigène méthylique tuberculeux.
- Certains antibiotiques (notamment Chl. d'auréomycine (*), Bacitracine, les 5 présentations de Pénicilline du Codex, le sulfate de Néomycine, la Novobiocine monosodique - suppl. 1968 -, la Streptomycine et la D.H. Streptomycine*, Chl. de Terrafungine ou d'oxytétracycline - suppl. 1968 -, Chl. de tétracycline).
- Les auto-vaccins.
- Les fils chirurgicaux et produits assimilés comme les laminaires (catguts, crins, fils, soies, etc.). Il s'agit d'un essai de stérilité classique, avec toutefois quelques variantes concernant le volume des milieux de culture, divers conseils concernant l'inclinaison des tubes, etc. (cf. Codex 1965, p. 261).
- Les collyres.
- Toutes les préparations injectables.
- Les produits sanguins d'origine humaine (plasma humain, sérum-albumine humaine, fibrinogène, etc.). A ce propos, le Codex français précise qu'aucun antiseptique n'est toléré pour ces produits (cf. édition 1965, page 824 et 968). C'est notamment à leur sujet que la Pharmacopée indique en note bas de page, à la page 1621, que les températures de contrôle pourront être au-dessous de + 37° C.
- Les gonadotrophines.
- Divers enzymes, notamment l'hyaluronidase.
- Divers produits opothérapiques, en particulier l'extrait de foie injectable, les solutés des diverses insulines, ceux de para-thyroïde, de lobe postérieur d'hypophyse, etc.
- Les huit sérums thérapeutiques figurant à la Pharmacopée.
- Certains solutés injectables nomément désignés, comme divers solutés d'éléments radio-actifs : ¹⁹⁸Au, ³²Phosp. de Na, etc.
- Différents produits réactogènes d'origine bactérienne (Toxine diphtérique, Tuberculines brute et purifiée).
- Les treize vaccins inscrits à la Pharmacopée.
- Les objets de pansement stériles (ouate, gaze, compresses, etc.).
- Les seringues, aiguilles, objets en matière plastique stériles. Les détails sont donnés p. 1396 (édition 1965) et p. 124 (suppl. 1968). Il est no-

(*) A signaler ici une anomalie. L'édition de 1965 de la Pharmacopée proposait une technique aujourd'hui dépassée, avec extraction au kaolin, centrifugation stérile, ensemencement sur milieu viande-foie et glucose-peptone. Le supplément 1968 annule ce procédé et renvoie aux essais de stérilité classiques.

tamment précisé que le contrôle de ce matériel se fera par prélèvement de 3 % du lot de stérilisation, avec un maximum de 10 unités, seringue ou aiguille. Il est en outre indiqué que l'efficacité du procédé de stérilisation est vérifié, de plus, par la présence de matériel témoin contaminé avec des germes particulièrement résistants au mode de stérilisation adopté. Le texte fait ici nettement allusion aux moyens utilisant les radiations et à certains germes de collection résistant aux radiations (cf. p. 124, suppl. 1968).

B. — Recherche ou Essai des substances pyrogènes.

Le Codex 1965 précise, pages 1615 et suivantes, que l'absence de substances pyrogènes (ou pyrétogènes en français) dans l'eau pour préparations injectables, ou dans les solutés aqueux, se vérifie en injectant un certain volume de ces préparations à des Lapins. Ceux-ci ne doivent pas présenter d'hyperthermie dans les conditions fixées par la Pharmacopée. Depuis la rédaction de ce texte, l'application de cette recherche a été étendue à d'autres produits et même à certains matériaux (bouchons, récipients, matières plastiques, etc.).

La Pharmacopée Française précise p. 1616 (1965) que les solutés injectables présentés sous un volume supérieure ou égal à 125 ml, ou portant l'indication « apyrogène », doivent donner des résultats non positifs à cet essai. Il existe, précise le Codex :

« des cas particuliers où il est nécessaire d'ajouter une substance déterminée pour contrebalancer l'action toxique du soluté. Reportez-vous alors aux monographies correspondantes. Quand certains solutés injectables de volume inférieur sont soumis au même essai, l'indication en est portée aux monographies particulières ».

Le Codex français précise ensuite les conditions de l'essai en procédant successivement à l'étude des points suivants :

Choix de l'animal. — (Lapins mâles ou femelles, pesant au moins 1.700 grammes, etc. pour les détails, classiques du reste, cf. p. 1616).

Choix du matériel. — Thermomètres, seringues, aiguilles, appareils de contention (cf. p. 1616 et 1617).

Technique de l'essai qui devra porter sur un lot de trois Lapins avec précisions (toujours très classiques) sur la préparation des animaux, la prise de température rectale témoin, et, enfin, la pratique de l'essai de la préparation (p. 1617).

Interprétation des résultats. — Le Codex précise deux points : l'essai est valable :

1) si aucun des Lapins ne révèle une élévation de température égale ou supérieure à 0,6°C et :

2) si la somme des trois températures ne dépasse pas 1,4°C.

Sont ensuite indiquées les conditions pour lesquelles l'essai doit être recommencé. Pour les détails, nous renvoyons le lecteur p. 1618 de la Pharmacopée Française 1965.

Substances, matériel et produits divers soumis à cet essai.

On peut dresser la liste suivante :

— Divers antibiotiques (Auréomycine chlorhydrate, Bacitracine, les cinq présentations de Pénicilline, Néomycine sulfate, les streptomycines — Strepto, et D.H.S. —, la Tétracycline chlorhydrate).

— Eau pour préparation injectable.

— Les gonadotrophines inscrites au Codex.

— L'héparine.

— L'hyaluronidase.

— Les produits sanguins d'origine humaine comme le plasma humain normal (la température du lapin isolé ne doit pas augmenter de + 1,1°C - cf. p. 824), la sérum-albumine humaine, le fibrinogène.

— Tous les solutés injectables.

— Mention particulière des préparations injectables d'extraits de foie.

— La Thiocolchicoside (p. 97 du supplément 1968).

— Les bouchons pour récipients destinés aux produits injectables (p. 1397 édition 1965).

— Les récipients en matière plastique (p. 1396 édition 1965). Dans ce dernier cas, il est précisé que l'essai doit être effectué sur un liquide obtenu après y avoir placé la matière plastique coupée en morceaux et l'avoir soumise à un autoclavage de 45 minutes à 120°C.

C. — *Titrage Biologique des substances histaminiques.*

La Pharmacopée Française exige, pour un certain nombre de produits, pratiquement l'absence de substances douées d'activité histaminique ou une tolérance de teneur. Le détail de cette recherche est donné à l'article « titrage » p. 1622 et suivantes. Il est notamment précisé ce qui suit :

« Ce titrage est effectué sur un fragment d'iléon de Cobaye maintenu en survie dans une solution nutritive. L'addition d'atropine à cette solution supprime les contractions spontanées éventuelles de l'organe et le rend insensible à des substances telles que l'acétylcholine dont les effets pourraient interférer avec ceux de l'histamine. Dans ces conditions, l'addition au liquide du bain de quantités convenables d'histamine provoque des contractions de l'organe d'amplitude croissant avec la concentration de la solution. En opérant successivement avec différentes doses d'une solution de chlorhydrate d'histamine de concentration connue et avec différentes doses de la solution à titrer, on cherche à obtenir une égalité d'amplitude de deux réponses obtenues respectivement avec les deux sortes de sub-

stances. Le rapport des doses ayant entraîné ces réponses égales permet de calculer la teneur en histamine de la solution à titrer. On s'assure, en fin d'expérience, de la nature histaminique de la contraction obtenue avec la solution inconnue en constatant que cette réponse n'apparaît plus après addition au bain d'une quantité convenable d'une substance anti-histaminique » (par ex. : la mépyramine) ».

Et la Pharmacopée décrit successivement *les réactifs* : solution isotonique nitritive (solution mère et solution diluée prête à l'emploi — cf. p. 1623), puis la *technique*. Pour les détails, nous renvoyons le lecteur aux pages 1623 et 1624 du Codex français (édition 1965).

Parmi les produits qui ne doivent pratiquement pas contenir de substances type histaminiques, ou qui sont soumis à des normes de tolérance, citons :

- Des *antibiotiques* : Bacitracine, Sulfate de Néomycine, Sulfate de Streptomycine, Dihydro-streptomycine (D. H. S.), Framycétine (sulfate).
- Des *enzymes* : (Chymotrypsine, Trypsine).
- Un *amino-acide* : Chlorhydrate d'Histidine.
- Des *substances d'origine opothérapiques* : (Extrait de foie et préparation injectable d'extrait de foie, soluté injectable d'A.C.T.H., soluté injectable de lobe postérieur d'hypophyse).
- Une *substance d'origine animale* : (l'héparine).

La Pharmacopée indique une teneur par gramme de substances histaminiques évaluée en Chl. d'histamine. Le tableau ci-dessous rend compte de ces exigences.

TABLEAU I.

Normes de tolérance en substances histaminiques.

Bacitracine (p. 159), pas plus de 33 μg par gramme.
Sulfate de Néomycine (p. 724), idem.
Sulfate de Streptomycine et D.H.S. (p. 1114), idem.
Sulfate de Framycétine (p. 496), pas plus de 30 μg par gramme.
Chymotrypsine, pas plus de 1 μg pour 10 U. d'activité enzymatique (p. 295).
Trypsine, idem (p. 1241).
Chl. d'Histidine, pas plus de 10 μg par gramme (p. 572).
Extrait de foie (p. 460), pas plus de 300 μg par gramme, rapporté à l'extrait anhydre.
Préparation injectable d'extrait de foie (p. 885), pas plus de 20 μg par gramme.
A.C.T.H. et soluté injectable d'A.C.T.H. (p. 68 et 1062), pas plus de 1/25 de μg par Unité A.C.T.H.
Héparine, pas plus de 10 μg par gramme (p. 560).

D. — *Recherche d'une toxicité anormale.*

La Pharmacopée Française fait procéder, pour diverses substances (drogues diverses, produits chimiques, matière plastique, etc.) à la recherche d'une toxicité anormale par essais sur des animaux de laboratoire (Souris, Lapins, Cobayes le plus souvent). Il n'est pas indiqué de méthode générale. A chaque article mentionnant cet essai, il est simplement précisé les conditions qui doivent être remplies. Il est parfois mentionné, en cas de réponse difficilement interprétable d'un premier résultat, les conditions qui imposent une reprise de l'essai. En fait, il s'agit des épreuves jadis appelées « essai d'innocuité » et que l'on a remplacées par l'expression « toxicité anormale ». Il s'agit plus généralement de vérifier soit l'absence d'une toxicité « anormale » pour les conditions normales d'emploi du produit, soit d'étudier la toxicité aiguë d'une substance particulière (par exemple l'aconit ou ses préparations). Parfois également il s'agit d'examiner le caractère spécifique d'une drogue (p. ex. l'insuline par étude de la cessation des convulsions hypoglycémiques sous l'action du glucose). Tous ces caractères particuliers seront exposés plus loin lors de l'examen du contrôle biologique de ces drogues spéciales.

Nous désirons simplement, dans le présent chapitre, exposer les grandes lignes du contrôle toxicologique tel que le comprend le Codex français.

Comme pour toute étude de ce type, les protocoles envisagent les points suivants :

- 1) Choix de l'animal.
- 2) Précisions sur le nombre et le poids des sujets.
- 3) Détermination du volume injecté et voie choisie.
- 4) Temps d'observation de l'animal.

Le plus souvent, l'épreuve est basée sur l'observation brutale de la constatation de la vie ou de la mort de l'animal. Parfois, des détails sont donnés sur la surveillance du poids. Quelquefois, pour certaines substances, des vérifications particulières doivent être faites concernant l'apparition ou non de symptômes spéciaux (paralysie, convulsions, etc.). Pour quelques produits, des examens spéciaux sont ajoutés (par ex. : absence d'effets nérosants, ou d'effet hémolytique : Anatoxine staphylococcique). Là encore, tous ces détails particuliers seront rapidement exposés lors de l'étude particulière de ces produits (voir plus loin). Enfin, dans quelques cas spéciaux, une précision extrême est fournie concernant notamment le solvant, la seringue, le diamètre et la longueur des aiguilles, la durée de la manipulation, l'alimentation et les conditions de conservation des animaux (exemple : Novarsenobenzène, p. 719).

Toutefois, quelques précisions peuvent être d'ores et déjà données concernant l'ensemble de ces essais.

Animaux de laboratoire.

Ceux le plus souvent cités sont :

- Souris, utilisées dans 33 essais.
- Cobayes, utilisées dans 25 essais.
- Lapins, utilisées dans 5 essais.

Voies d'injection.

Elles sont toujours indiquées. Parfois, des précisions sont données en ce qui concerne la vitesse d'injection. Par exemple, dans l'essai de toxicité aiguë sur la souris, pour le sulfate de Framycétine il est indiqué p. 494, que la durée d'injection doit être d'environ 10 secondes. Pour la Streptomycine (p. 1113), il s'agit de 5 secondes. D'autres exemples pourraient être cités.

Ce sont, bien entendu, les voies les plus classiques, soit :

- Sous-cutanée, préconisée 15 fois.
- Intra-veineuse, préconisée 13 fois.
- Intra-musculaire, préconisée 2 fois.
- Intra-péritonéale, préconisée 2 fois.
- Dans un article, aucune précision n'est donnée : on indique seulement « voie parentérale ».

Temps d'observation des animaux.

Il est variable suivant le but recherché au point de vue toxicologique. Le plus souvent, il s'agit de surveiller les animaux 48 heures ou 7 jours. Mais des cas particuliers font qu'il est parfois demandé un examen à des périodes différentes (p. ex. : 6 mois chez des cobayes pour vérification d'absence de Mycobactéries pathogènes, 21 jours pour le vaccin antipesteux, etc.). Parfois encore, des vérifications spéciales sont demandées par autopsie des animaux (p. exemple pour le vaccin antipesteux : notation de l'absence de lésions pesteuses, etc.). Enfin, dans certains cas, le Codex français demande la détermination de la DL/50 (ex. : vaccin anti-amaril, Aconit napel-racine, Novarsenobenzène).

Interprétation des résultats.

Comme nous le disions plus haut, la Pharmacopée est assez discrète sur ce point. On trouve rarement mention des conditions dans lesquelles l'examen doit être repris, un premier essai étant considéré comme insuffisant de par ses résultats. Toutefois, on trouve, dans quelques monographies, diverses indications sur ce point. Par exemple, pour l'étude de la toxicité éventuelle des matières plastiques, on pratique une injection intra-veineuse

à 5 souris de 20 g d'une solution convenablement préparée (voir plus loin). On ne doit pas observer de signe d'intoxication au bout de 4 heures, 24 heures et 48 heures. Si cet essai n'est pas concluant, on doit refaire le même sur 10 souris. Celles-ci doivent être en vie au bout de 48 heures. Dans ces conditions, le contrôle est considéré comme satisfaisant.

Produits pour lesquels cet essai est demandé.

On peut dresser la liste suivante, avec l'indication de l'animal utilisé :

- Aconit (racines) et teinture d'Aconit (Souris).
- A.C.T.H. et son soluté injectable (Souris).
- Les cinq anatoxines du Codex 1965 (Cobayes, Souris, Lapins).
- Antigène méthylique (Cobaye).
- Divers *antibiotiques* : Auréomycine (Souris), Bacitracine (Souris), les diverses Pénicillines (Souris), les 3 Erythromycines (base, propionate et stéarate) (Souris), Sulfate de Framycétine (Souris), Sulfate de Néomycine (Souris), Nystatine (Souris), Spiramycine (Souris), Streptomycine et D.H.S. (Souris), Tétracycline (base et chlorhydrate) (Souris).
- Les produits d'origine humaine tirés du Sang (Fibrinogène, γ globulines humaines, Plasma humain normal citraté desséché, sérum-albumine humain). (Tous sur Souris, sauf sérum-albumine qui se fait sur Souris ou Cobaye).
- Les huit sérums thérapeutiques du Codex (Cobaye).
- Des produits chimiques : Novarsenobenzène (Souris), Suramine sodique (Souris).
- L'insuline (Lapin).
- Les Tuberculines (Cobaye).
- Les treize vaccins du Codex (Cobayes, Souris, Lapins).
- Les matières plastiques (épreuve sur souris, après passage du plastique coupé en morceaux, placé dans l'eau et autoclavé 45 minutes à 120° C, pour les détails voir Codex 1965, p. 1395).

Le lecteur intéressé par le détail de l'ensemble de ces essais, se reportera à la Pharmacopée Française, pour la lecture de chacune des monographies.

CHAPITRE III.

TITRAGE DES SERUMS ET VACCINS

La 8^e édition de la Pharmacopée Française de 1965 est relativement pauvre en sérums et vaccins. C'est parce qu'un certain nombre des articles concernant ces produits biologiques ont été réservés, n'étant pas complètement terminés au moment de l'impression de cet ouvrage. Ils paraîtront

sous peu dans un des suppléments, soit dans la 9^e édition. Il s'agira notamment des vaccins viraux (contre la poliomyélite, la rougeole, etc.). De plus, les titrages antigéniques d'un certain nombre des sérums et vaccins figurant dans la présente édition de 1965, sont à reprendre complètement. Les nouvelles rédactions sont en cours d'exécution et pratiquement les contrôles qui figurent dans cette 8^e édition sont déjà remplacés. Les titrages antigéniques sont rapprochés des normes O.M.S. internationales, l'interprétation statistique y est mentionnée. Il s'agit notamment des anatoxines diphtérique et tétanique, des vaccins anticoquelucheux, B.C.G. etc.

Du reste, l'obligation d'obtenir en France le visa ou l'autorisation de mise sur le marché de tous produits médicamenteux connus sous le nom de spécialité pharmaceutique (même pour les produits inscrits au Codex) (voir plus haut les détails déjà donnés sur ce sujet), fait que la Commission compétente exige déjà l'application de ces nouvelles normes encore officieuses, mais déjà en usage. Dépassant donc, dans ce chapitre, le cadre étroit de la Pharmacopée, nous signalerons au passage ces points spéciaux.

Quoi qu'il en soit, en son état actuel, le Codex français 1965 comporte les monographies suivantes :

— Cinq anatoxines (Botulique, Diphtérique, Diphtérique et Tétanique mélangées, Staphylococcique, Tétanique).

— Des auto-vaccins.

— Huit sérums thérapeutiques d'animaux hyperimmunisés (anti-gangréneux, anti-rabique, anti-rouget, anti-tétanique, anti-venimeux, anti-diphtérique, anti-charbonneux, anti-botulique).

— Treize vaccins (anti-amaril, anti-cholérique, anti-coquelucheux adsorbé, anti-pestueux, anti-rabique, anti-rickettsien, anti-staphylococcique, anti-streptococcique, anti-typho-paratyphoïdique A et B, anti-variolique, B.C.G., anti-grippal, mixte D.T.T.A.B.).

Il n'est pas question dans cette publication, déjà suffisamment longue, de donner le détail de tous ces contrôles et singulièrement des titrages. Nous nous contenterons d'indiquer successivement les principes antigéniques de ceux-ci. Le lecteur est prié de se reporter aux articles de la Pharmacopée Française dont nous indiquons la pagination pour la 8^e édition (1965).

A. — *Les anatoxines et les vaccins.*

1. *Anatoxine botulique* (p. 114).

a) *Contrôles inscrits au Codex - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité* : Sur 3 cobayes (injection de 5 ml, voie sous-cutanée) ou 3 souris (2 ml, voie idem) ; observation 7 jours.

b) *Titration antigénique* : Sur 3 cobayes de 400 g, par voie S.C., injection de 3 doses d'anatoxines adsorbées sur phosphate de calcium à 5 jours d'intervalle. Epreuve de résistance, 10 jours après la dernière injection à 10 D.M.M./cobaye ou à 100 D.M.M./souris.

2. *Anatoxine staphylococcique* (p. 117).

a) *Contrôles inscrits au Codex - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité* par vérifications diverses. *Absence de toxicité anormale* sur lapins (spécialement sélectionnés pour leur taux bas en antitoxine staphylococcique), injection de 4 ml par voie I.V. et observation 3 jours. *Absence effet nécrosant*, sur des lapins de même type, injection 4 ml par voie S.C. et de 0.2 ml par voie I.D. Etude de la peau pendant 3 jours. *Absence effet hémolytique*, contre des globules rouges de lapin.

b) *Etudes antigéniques*. Le Codex préconise la détermination du pouvoir de combinaison et un titrage antigénique proprement dit.

Pouvoir de combinaison : il s'agit de préciser la plus petite dose d'anatoxine qui provoque une hémolyse complète de globules rouges de lapin. Un mélange de 2 U.A. d'antitoxine et des dilutions diverses de l'anatoxine à éprouver (contact : 30 minutes à + 37° C) est mis en contact avec la toxine staphylococcique et des hématies de lapin (lecture après contact, 1 heure à + 37° C).

Titration antigénique : sur 3 lapins (sélectionnés cf. ci-dessus) injection de 3 doses d'anatoxine, voie S.C., 4 jours d'intervalle (1 ml, 2 ml, 4 ml). Prélèvement et pool des sérums au 7^e jour, contre toxine staphylococcique. Le pouvoir antitoxique doit se situer entre 2 et 4 U.A./ml.

3. *Anatoxine diphtérique* (p. 115).

a) *Contrôles inscrits au Codex - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité* sur cobaye, injection 5 ml (voie S.C.), observation 7 jours.

b) *Titration* :

— par flocculation selon Ramon, résultat exprimé en Lf (au minimum 30 Lf/ml) ;

— par titrage biologique sur le cobaye (type « Stimulans method ») 10 cobaye 250 g, 2 injections S.C. de 1 ml, chaque injection séparée par 15 jours ; après 15 jours, saignée et pool des sérums contre toxine étalon. Le pouvoir antitoxique devra être au minimum 0.5 U.A./ml.

c) *Titration envisagée pour le futur, mais déjà préconisée officieusement* (non Codex pour l'instant).

Anatoxine diphtérique simple (principe « Challenge method »).

Technique en 6 points, log dose-réponse (3 pts étalons, 3 pts anatoxine x). Cobaye de 300 à 350 g, 126 cobayes au total, *unique* injection de 1 ml, voie S.C.. Challenge 28 jours après avec une dose de toxine de 20 DL 50 au moins. Numération des survivants entre la 96^e heure et les 10 jours suivants. Calcul du résultat par méthode statistique (Tables de la Pharmacopée Française ou tables de Wilson et Worcester, ou toute autre).

Anatoxine diphtérique adsorbée (même principe).

4. *Anatoxine tétanique* (p. 119).

a) *Contrôles inscrits au Codex - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité* sur 5 cobayes de 300 g, injection de 5 ml (voie I.M.), observation 7 jours.

b) *Titrage* :

— par floculation selon Ramon, résultat exprimé en Lf (au minimum au moins 15 Lf/ml) ;

— par titrage biologique, sur le cobaye (type « Stimulans method ») 10 cobayes 300 à 400 g, 2 injections S.C. de 1 ml chaque séparée par 15 jours ; après 15 jours saignée et pool des sérums contre toxine étalon. Le pouvoir antitoxique devra être au minimum de 0,5 U.A./ml.

c) *Titrage envisagé pour le futur, mais déjà préconisé officieusement* (non Codex pour l'instant).

Anatoxine tétanique simple (principe « Challenge method »).

Technique en 6 points (cf. ci-dessus, anatoxine diphtérique) soit sur cobayes de 300 à 350 g, 126 cobayes au total ; soit sur souris de 16 à 18 g, *de race convenablement choisie*, 126 souris au total. Pour les deux cas, *unique* injection de 1 ml, voie S.C., challenge 28 jours après avec une dose de toxine de 20 DL 50. Numération des survivants au bout de 10 jours. Calcul statistique des résultats comme il est dit pour l'anatoxine diphtérique.

Anatoxine tétanique adsorbée (même principe que ci-dessus, mais sur la souris de 16 à 18 g seulement). 126 souris par titrage, injection unique de 1 ml, voie S.C., challenge 28 jours après avec une dose de toxine de 20 DL 50 au moins, numération des survivants au bout de 10 jours. Calcul statistique comme il est dit plus haut.

5. *Mélange mixte anatoxines diphtérique-tétanique* (p. 116).

a) *Contrôles inscrits au Codex - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité* sur 6 cobayes : 3 sont injectés par voie I.M., 3 par voie S.C. Observation : 7 jours.

b) *Titrage* :

— par floculation selon Ramon, résultats exprimés en Lf (au moins 15 Lf/ml pour la diphtérique et 10 Lf/ml pour la tétanique) :

— par titrage biologique sur le cobaye (type « Stimulans method ») 10 cobayes de 300 à 400 g, 2 injections S.C. de 2 ml séparées de 15 jours; après 15 jours, saignée et pool des sérums contre chacune des 2 toxines étalons. Le pouvoir antitoxique devra être au moins de 0.5 U.A./ml pour chacune des anatoxines.

6. *Vaccin anti-amaril* (p. 1257).

Il s'agit d'un vaccin à base de la souche 17 D du virus de la Fièvre jaune, constitué à partir d'une suspension aqueuse de tissu d'embryon de poulet inoculé avec la souche 17 D et convenablement traité.

a) *Contrôles du Codex - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité*. Sur cobaye de 250 à 500 g, injection I.P., surveillance 7 jours.

b) *Titrage d'activité*: Sur souris, par voie intra-cérébrale, par détermination de la DL 50. Chaque dose vaccinale doit contenir au moins 500 DL 50/souris.

7. *Vaccin anticholérique* (p. 1258).

Il s'agit d'un vaccin contenant *Vibrio cholerae* S en quantité suffisante, de souche Inaba et Ogawa (en nombre égal) ou de toute autre souche, contenant des antigènes O. Les germes sont tués suivant une technique appropriée.

a) *Contrôles inscrits au Codex - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité*: par injection S.C. à 6 souris observées pendant 7 jours.

b) *Titrage d'activité*: Par détermination d'un indice d'immunité basé sur les rapports d'une sorte de DL/50 du vaccin expertisé et d'un vaccin témoin étalon. Cette DL/50 se fait sur deux lots de 50 souris recevant chacun l'un des deux vaccins précédents, 15 jours après, chacun des 2 lots reçoit, par voie I.P., des doses croissantes de dilution de *Vibrio cholerae* virulent. On en déduit les 2 DL 50, dose de germe (taux de dilution) pour laquelle 50 % des souris sont tuées. L'indice d'immunité doit être supérieur à 10.

8. *Vaccin anticoquelucheux adsorbé* (p. 1259): A base de *Bordetella pertussis* tués.

a) *Contrôles inscrits au Codex - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité*: par inoculation de 1 ml (voie S.C.) de 15 à 20 g. On doit constater que la légère perte de poids des premiers jours suivant l'injection est compensée en 2 semaines.

b) *Vérification de l'antigénicité*: En 1965, le Codex n'avait retenu que le taux suffisant du pouvoir agglutinant du sérum des souris vaccinées.

c) *Contrôles envisagés pour le futur, mais d'ores et déjà exigés pour le vaccin circulant en France* (non Codex pour l'instant).

— *Contrôle d'absence d'activité toxique anormale* : par inoculation de 5 ml (voie I.P.) à un lot suffisant de souris d'une race à croissance rapide (10 souris au moins de 14 à 16 g). Pas de perte de poids en 78 heures. Gain d'au moins 3 g au 5^e jour.

— *Titrage antigénique* : protection de la souris (souche convenablement choisie) inoculée par voie intra-cérébrale ou sous-occipitale avec une souche de *Bordetella pertussis* (convenablement choisie pour sa virulence) par le vaccin. Usage de lots suffisamment importants pour permettre l'exploitation statistique des résultats.

9. *Vaccin antipesteux* (p. 1269) : Vaccin vivant à base de *Pasteurella pestis*, souche V.V. 76.

a) *Contrôles demandés par le Codex - Contrôles de pureté bactériologique* : par ensemencement sur gélose nutritive et bouillon portés 3 jours à + 37° C. On ne doit pas trouver d'autres germes que ceux du vaccin. *Innocuité* : par injection par voie S.C. du vaccin à 2 souris et 2 cobayes. Surveillance pendant 21 jours. Les animaux doivent rester vivants et on ne doit pas retrouver de lésions pesteuses après sacrifice et autopsie.

b) *Contrôle d'efficacité* : Vérification de la protection de souris et cobaye contre une souche virulente de *Past. pestis* ou une suspension de rate pesteuse.

10. *Vaccin antirabique* (p. 1261) : Vaccin vivant à base de la souche historique Pasteur du 19/11/1882 (virus rabique).

a) *Contrôles demandés par le Codex - Stérilité* (cf. p. 1618) *Innocuité* : vérifiée par injection (voie S.C.) à 6 lapins de 2 kg. Observations un mois.

b) *Contrôle d'activité* :

— Protection de lapins vaccinés par voie S.C., 20 jours consécutifs, contre un virus fixé, injecté par voie intra-cérébrale.

— *Idem* souris vaccinées par voie I.P. pendant 14 jours consécutifs, contre un virus fixé, injecté par voie intra-cérébrale.

11. *Vaccin anti-rickettsies* (p. 1263).

Il s'agit d'un vaccin contre le typhus exanthématique, à base de germes cultivés sur poumon de lapin, tués et formolés.

a) *Contrôles demandés par le Codex - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité* : sur souris, cobayes, par voie S.C., observations pendant 7 jours.

b) *Contrôle d'antigénicité* :

— Etude de la montée des agglutinines anti-rickettsies chez des animaux vaccinés (cobayes de 300 g, recevant 3 injections de 1 ml à 8 jours d'intervalle et saignée le 15^e jour).

— Etude du pouvoir neutralisant du sérum de l'animal vacciné (cobayes, voir ci-dessus) par injection, sous la peau du lapin, d'un mélange de ce sérum et de doses variées de Rickettsies.

12. *Vaccin anti-Staphylococcique* (p. 1265).

Il s'agit d'un vaccin tué, tel qu'un ml doit contenir 6 milliards de germes.

Contrôles du Codex : Stérilité (cf. p. 1618) - *Innocuité*, sur deux cobayes de 300 g, injection de 1 ml. Les animaux doivent retrouver leur poids initial au 7ème jour.

13. *Vaccin anti-Streptococcique* (p. 1266).

Mis à part le changement de germe, cet article est identique au précédent.

14. *Vaccin anti-typho-paratyphoïdique A. B.* (p. 1266) ou vaccin T.A.B. préparé à partir des 3 germes tués 1 heure à + 56° C et qui contient des facteurs antigéniques O, H et Vi (T). Sa composition est telle qu'un ml contient 750 millions de *Salmonella typhi*, 250 millions de *Salmonella paratyphi A* et 500 millions de *Salmonella paratyphi B*.

Contrôle : Stérilité (cf. p. 1618) - *Innocuité*, par injection au cobaye de 300 g et vérification de la reprise du poids initial au 9ème jour.

15. *Vaccin antivariolique* (p. 1267).

C'est le vaccin Jennerien classique. Il comporte :

— *Un contrôle bactériologique*, qui permet la vérification d'absence de germes pathogènes (Streptocoque hémolytique, *Esch. coli*, *Plectridium tetani* et autres anaérobies sporulés pathogènes et Bacille du Charbon). Le Codex admet une tolérance de 1000 germes adventices au ml.

— *Le contrôle de l'activité spécifique*, par titrage sur la peau du lapin ou la membrane chorio-allantoïdienne de l'oeuf. Le Codex exige au moins 1 pustule par cm² de la peau du lapin et chez l'oeuf embryonné au moins 15 à 20 lésions élémentaires par membrane.

Il est probable que ces exigences françaises seront modifiées sous peu.

16. *Vaccin B.C.G.* (p. 1268).

Selon la Pharmacopée Française, on doit y comprendre le vaccin frais et le vaccin sec. Les contrôles actuels sont les suivants :

- a) *Pureté bactériologique* (qui est un contrôle classique type stérilité).
- b) *Innocuité*, par injection du vaccin à 3 cobayes albinos de 250 g (voie S.C.), conservation 3 semaines (pas de perte de poids, aucun

symptôme anormal), puis sacrifie au bout de 6 mois (absence de lésion tuberculeuse).

c) *Pouvoir allergisant*, injection au cobaye de 250 g (voie S.C.). Vérification du virage tuberculinique au bout de 3 semaines par I.D.R. de 100 U.I. de tuberculine purifiée. Le diamètre de la lésion doit être \geq à 15 mm.

d) *Activité résiduelle* : Le Codex préconise la classique épreuve de Jensen.

Là encore, il est prévu une modification de cette monographie à plus ou moins grande échéance.

17. *Vaccin antigrippal* (p. 1271).

Il s'agit d'un extrait de culture de diverses souches de virus de la grippe cultivé sur oeuf de poule embryonné, par adsorption sur globules rouges formolés.

a) *Contrôles demandés par le Codex - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Essai dit d'inactivation*, par vérification d'absence de culture virale sur oeuf embryonné, et d'absence de pouvoir pathogène sur 10 souris recevant le vaccin par aérosol - *Essai d'innocuité* par inoculation du vaccin à 4 cobayes par voie S.C.

b) *Titrage d'antigénicité* : Par étude de la montée des anticorps chez des animaux vaccinés :

- après injection S.C. à 3 furets
- après injection I.P. à 10 souris.

18. *Vaccin mixte anatoxines diphtérique-tétanique et anti-typhoparatyphoïdique A et B* (p. 1272).

Il s'agit d'un vaccin mixte dont la composition répond à la formule suivante : Anatoxine D : 30 Lf, Anatoxine T : 12,5 Lf, *Salmonella typhi* : 425 millions de germes, *S. paratyphi* A : 150 millions de germes, *S. paratyphi* B : 275 millions de germes, pour 1 ml.

a) *Contrôles demandés par le Codex - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité* : Sur 2 cobayes de 300 g, vérification de la reprise du poids initial en 9 jours après l'injection.

b) *Titrage d'activité* : Le vaccin doit répondre aux essais prévus pour chacune des 2 anatoxines et pour le vaccin T.A.B. (voir plus haut).

Cette brève revue renferme toutes les substances antigéniques (anatoxines et vaccins) faisant l'objet de monographie dans la Pharmacopée Française 1965, mais ainsi que nous l'avons dit plus haut, d'autres articles seront publiés ultérieurement, concernant d'autres vaccins.

Ceci concerne en particulier des vaccins viraux comme celui anti-polio-myélique entre-autres. Il est probable que ces monographies seront alignées

sur les prescriptions et recommandations prévues pour les Pharmacopées ou nomenclatures internationales (Codex européen, O.M.S.).

Précisons, en outre, qu'en application de la législation sur les spécialités pharmaceutiques en France, les fabricants de tels vaccins sont déjà soumis à une réglementation que nous n'avons pas le loisir de développer ici (voir plus haut, chapitre I).

B. — *Les sérums.*

1. *Sérum antituberculeux* (p. 972).

a) *Contrôle général : Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité*, injection S.C. au cobaye et observation 7 jours.

b) *Titration des anticorps* : Vérification du pouvoir antitoxique sur la toxine tuberculeuse injectée à la souris, en deux opérations : mise au point de la dose d'épreuve par détermination de la D.M.M. Souris, puis titration classique sur la Souris.

2. *Sérum anticharbonneux* (p. 974).

a) *Contrôle général - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité*, injection S.C. au cobaye de 300 g, observation 7 jours.

b) *Contrôle d'efficacité* par vérification de la protection du cobaye vacciné (voie I.P.) contre l'injection de Bacille du charbon (2 milliards de Bacilles, voie S.C., 24 heures après vaccination). Trois ml de sérum doivent protéger le cobaye 8 jours au moins.

3. *Sérum anti-diphtérique* (p. 974).

a) *Contrôle général - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité* par injection de 5 ml au cobaye de 300 g et observation 48 heures (voie S.C.).

b) *Titration des anticorps* : Détermination du pouvoir antitoxique après contact pendant 1 heure d'une dose totale L + de Toxine diphtérique avec 1 ml de diverses dilutions de sérum à contrôler. Injection au cobaye de 250 g par voie S.C. La dose correspondant au cobaye mort à la 96ème heure contient 1 U.I. La Pharmacopée exige une teneur de 500 U.I. par ml.

4. *Sérum antitétanique* (p. 982).

a) *Contrôle général - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité* par injection de 5 ml au cobaye de 300 g par voie S.C. et observation 48 heures.

b) *Titration des anticorps* : Détermination du pouvoir antitoxique après contact 1 heure d'un dixième (1/10) de dose L + de toxine tétanique avec 1 ml de diverses dilutions du sérum à contrôler. Injection au cobaye de 350 g par voie I.M. La dose correspondant au cobaye mort à la 96ème heure contient 1/10 d'U.I. La Pharmacopée exige une teneur \geq à 150 U.I./ml.

5. Sérums anti-gangréneux (p. 976).

La Pharmacopée Française spécifie que la protection doit s'étendre à 7 germes. Sérums contre :

<i>Welchia perfringens</i>	type A
»	» type B (ou <i>W-agni</i>)
»	» type C (ou <i>W-agni</i> , var.- <i>paludis</i>).
<i>Clostridium Septicum</i>	(anc ^t Vibrion Septique)
»	<i>oedematiens</i>
»	<i>histolyticum</i>
»	<i>sordelli</i>

a) *Contrôle général - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité* par injection au cobaye de 350 g, voie S.C., et observation pendant 7 jours.

b) *Contrôle d'efficacité* : Par vérification de la protection de la souris de 19 g injectée par voie I.V., contre les toxines *spécifiques*. Le résultat doit être exprimé en U.I. Par exemple, l'antitoxine *perfringens* α doit protéger contre une toxine A, riche en lécithinase α et très pauvre en hémolysine oxydable Θ . A défaut, on peut déterminer l'activité antilécithinasique α des sérums à contrôler à l'aide d'une toxine A complexe, c'est-à-dire possédant une lécithinase α , plus une hémolysine Θ riche.

Le Codex Français prévoit des sérums bruts (Monovalents ou plurivalents) et des sérums purifiés. Les titres des sérums purifiés sont précisés comme suit :

Titres exigés pour les sérums monovalents.

S. anti- <i>perfringens</i> A :	600 U.I. α par ml
S. anti- <i>septicum</i> :	600
S. anti- <i>oedematiens</i> :	2000
S. anti- <i>histolyticum</i> :	800

Titres exigés pour les sérums plurivalents.

Sérum résultant du mélange des 4 précédents et donnant, *in fine*, les titres suivants : 200 U.I. anti-*perfringens* α , 200 U.I. anti-*septicum*, 100 U.I. anti-*oedematiens*, 30 U.I. anti-*histolyticum*.

6. Sérum anti-rabique (p. 980).

Il s'agit d'un sérum de cheval traité par le virus fixe Pasteur.

a) *Contrôles généraux - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité* par injection (voie S.C.) au cobaye.

b) *Contrôle d'activité* : Par étude du pouvoir protecteur de diverses dilutions de sérum sur souris, comparativement à des dilutions de sérum

international étalon et au sérum normal de cheval. Les souris sont observées pendant 2 semaines et la mortalité appréciée selon la méthode des totaux cumulatifs. Après les calculs statistiques, on doit noter un pouvoir protecteur minimal égal à 2,5 fois celui de l'étalon (qui lui-même doit répondre à une $D/50 \leq$ à la dilution 1/300).

7. *Sérum anti-rouget* (p. 981).

a) *Contrôles généraux - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité* effectuée sur cobaye.

b) *Contrôle d'activité* : Par protection de 3 souris contre l'action d'une souche virulente.

8. *Sérums anti-venimeux* (p. 983).

Les sérums doivent être actifs contre *Vipera aspis* et *Vipera berus*. D'autres sérums pour d'autres protections contre les venins, peuvent être préparés.

a) *Contrôles généraux - Stérilité* (cf. p. 1618) - *Innocuité* faite sur le cobaye.

b) *Contrôle d'activité* : Par vérification de l'action anti-toxique du sérum sur les venins spécifiques sur lapins ou souris.

— *Lapin* : Titrage de l'activité anti-aspis et anti-berus par injection I.V. d'un mélange venin-sérum.

— *Souris* : Vérification de l'activité antivenimeuse des autres sérums antivenimeux par injection I.V. du mélange sérum-venin spécifique (10 à 12 souris par groupe).

La Pharmacopée Française exige que les sérums anti-aspis et anti-berus neutralisent au moins 3 D.M.M. par kg-lapin.

C. — *Les auto-vaccins.*

Un autovaccin est un vaccin préparé à partir d'une ou plusieurs espèces bactériennes isolées d'un malade, et destiné à ce seul et même malade.

Dans un premier temps, on doit procéder à l'isolement des microbes que peut contenir le produit pathologique. Le choix des milieux d'isolement découle de l'examen direct, après coloration du produit pathologique. A partir des colonies isolées, on procède à l'identification des germes en établissant leurs diverses caractéristiques biologiques.

Le germe est alors ensemencé sur des quantités suffisantes de milieu : celui-ci est mis à l'étuve à 37°, généralement pendant vingt-quatre heures. Si l'ensemencement a été fait sur milieu solide, la culture est récoltée par lavage de la surface gélosée avec du soluté isotonique de chlorure de sodium.

Si le milieu utilisé était liquide, la culture est centrifugée, le culot microbien lavé, est repris avec du soluté isotonique de chlorure de sodium.

La suspension microbienne, en soluté isotonique de chlorure de sodium, est alors stérilisée, soit par chauffage (la température ne doit pas dépasser de plus de 1° ou 2° la température de mortalité de l'espèce considérée), soit par un moyen chimique : alcool, phénol, formol, iode, etc.

Sur une fraction de la suspension stérilisée, on détermine la teneur en bactéries au millilitre (généralement par opacimétrie), et on dilue avec le soluté isotonique de chlorure de sodium la suspension stérilisée de façon à obtenir la teneur en germes au millilitre, demandée pour l'autovaccin.

La suspension est alors répartie en ampoules. On s'assure sur plusieurs de ces ampoules que l'autovaccin préparé est pur, c'est-à-dire ne contient pas de germe de souillure, même tué.

CHAPITRE IV.

TITRAGE MICROBIOLOGIQUE DES ANTIBIOTIQUES

Le Codex Français de 1965 décrit longuement les conditions dans lesquelles les dosages bactériologiques des antibiotiques doivent être exécutés (p. 1601 à p. 1615).

Bien entendu, il est précisé que :

« les deux principales méthodes utilisées pour le dosage microbiologique des antibiotiques sont :

- la méthode par diffusion
- la méthode par turbidimétrie ».

Les principes mis en oeuvre sont exposés p. 1601.

« Le principe des dosages bactériologiques est le suivant : on fait agir, sur une culture microbienne choisie pour sa sensibilité, et dans des conditions aussi semblables et reproductibles que possible, d'une part une série de doses judicieusement choisies d'un produit de référence (étalon), d'autre part des doses semblablement espacées du produit à titrer (échantillon). On mesure ensuite la réponse donnée par chaque dose de l'étalon ou de l'échantillon ; à l'aide des réponses correspondant à chaque dose d'étalon, on trace une courbe étalon, grâce à laquelle on calcule ensuite, par interpolation, l'activité de l'échantillon. Si l'essai a été prévu de façon telle que, dans une gamme raisonnable de concentrations, il existe une relation linéaire entre les doses utilisées et les réponses, les résultats obtenus pour l'étalon et l'échantillon peuvent être combinés, et l'activité relative de l'échantillon par rapport à l'étalon est calculée statistiquement ; on peut en outre s'assurer de la validité du titrage et en évaluer la précision ».

La Pharmacopée Française expose alors en détail chacune des deux méthodes, la technique (appareillage et milieux de culture) comme le calcul des résultats et l'estimation de la précision interne du titrage et sa validité.

A. — *Méthode par diffusion* (p. 1601-1607).

a) D'abord on présente la méthode. Le matériel doit être préparé à partir d'une couche de milieu nutritif glucosé, ensemencé avec un « germe choisi », et des cylindres d'acier inoxydable ou des disques de papier. L'activité inhibitrice est appréciée après 16 heures d'incubation (p. 1601) par la mesure des zones d'inhibition.

b) Le Codex décrit ensuite l'appareillage et les milieux (p. 1602). Les titrages peuvent être exécutés sur des boîtes de Petri (diamètre préconisé : 100 mm) - (boîtes en verre ou en plastique, bien vérifier la planification du fond de la boîte), ou des boîtes carrées ou rectangulaires. Les dilutions d'antibiotiques sont placées soit dans des cylindres, soit sur des disques de papier spécial, soit sur des perles de porcelaine poreuses, soit dans des cavités découpées dans la gélose. Les spécifications de tout ce matériel sont données. Le détail de la préparation de la gélose et la répartition dans les boîtes sont décrits, avec notamment la technique à une couche gélosée ou à deux couches. La monographie précise que les détails des formules des milieux de culture sont donnés en annexe du présent article ou dans ceux relatifs à chaque antibiotique le cas échéant.

c) Préparation des dilutions décrite page 1603.

d) Conduite de l'essai et calcul statistique.

Le Codex français décrit deux méthodes : la méthode simplifiée et la méthode factorielle.

1. *Méthode simplifiée* (p. 1603-1605).

Elle est préconisée dans le cas où les titrages sont effectués en boîte de Pétri et nécessite 12 boîtes pour la courbe étalon et 3 boîtes pour l'antibiotique à titrer. On travaille avec cinq dilutions de l'étalon dont l'une, la médiane, sera le centre des calculs, et avec une dilution de l'échantillon, supposée se trouver de la même activité que la dilution médiane de l'étalon.

Sont successivement décrites la méthode des cylindres, celle des disques ou des perles poreuses, celle des cupules découpées. Page 1604 on donne les indications pour le calcul des résultats. On détermine d'abord les moyennes corrigées (36 réponses pour l'étalon, 9 réponses pour l'inconnu), puis on trace la courbe (droite), suivant le type log dose-réponse - diamètre des zone d'inhibition. Connaissant, bien entendu, la valeur de la courbe (droite) étalon, on lit facilement l'activité d'une solution donnant un diamètre d'inhibition égale (après correction). On calcule alors l'activité réelle de l'échantillon

considéré, en tenant compte de la dilution effectuée avec ledit échantillon. Et le Codex précise :

« Si l'activité ainsi calculée est inférieure à 60 % ou supérieure à 150 % de l'estimation faite pour effectuer la dilution, répétez le dosage en utilisant une estimation plus proche de la réalité (le dosage est d'autant plus précis que l'estimation se rapproche plus du titre réel) ».

2. Méthode factorielle.

C'est la plus employée en règle générale. Elle est applicable aux titrages en boîte de Pétri comme en grandes boîtes rectangulaires. Elle utilise un nombre *égal* de dilutions de l'étalon et de chaque échantillon à titrer, semblablement espacées en progression géométrique. Elle permet, en outre, d'estimer la précision interne et la validité du titrage. On utilise trois dilutions de l'étalon et trois dilutions de l'échantillon à titrer. La Pharmacopée française indique que l'on peut exécuter ces titrages soit en boîtes de Pétri (neuf boîtes qui recevront chacune 6 cylindres ou 6 disques), ou en grandes boîtes lesquelles permettent de diminuer les manipulations. Le Codex précise :

« Avec 3 boîtes de 30 × 10 cm. on peut titrer avec la même précision qu'avec 18 boîtes rondes, deux échantillons par rapport à un étalon ».

On décrit ensuite, p. 1606, la préparation du titrage selon la méthode dite des carrés latins. La suite des manipulations est très classique et il est inutile de la rappeler ici. Le détail des calculs statistiques est décrit page 1607. En gros, on peut dire que le titre relatif de l'échantillon par rapport à l'étalon est déterminé à l'aide de la Σ des neuf lectures obtenues pour chaque dilution de l'étalon et de l'échantillon. Le Codex prévoit le cas où une ou plusieurs lectures des zones d'inhibition ne peuvent être faites (accident, contamination, glissement du disque, etc.). Une formule mathématique est donnée qui enregistre toutes les données de l'expérience. L'antilogarithme de la valeur trouvée donne en % l'activité de l'échantillon par rapport à l'étalon. On obtient l'activité réelle en multipliant cette valeur par l'activité estimée de l'échantillon lors de sa dilution. De plus, par une note en bas des pages 1607 et 1608, le Codex indique comment estimer la précision interne d'un tel titrage et sa validité.

B. — Méthode turbidimétrique (p. 1608-1610).

a) La Pharmacopée précise qu'on introduit, dans une série de tubes stérilisés, pour les uns des quantités croissantes et exactement connues d'étalon de référence et, pour les autres, des quantités croissantes et estimées équivalentes d'antibiotiques à titrer. On répartit ensuite dans chaque tube un volume constant de milieu nutritif ensemencé avec des germes sensibles à l'antibiotique à titrer. Après 3 à 4 heures d'incubation au B.M. à tempé-

rature convenable, l'importance de la pousse dans chaque tube est mesurée au photomètre électrique. La croissance étant d'autant plus faible que la dose inhibitrice dans le tube est plus élevée.

b) La Pharmacopée décrit ensuite l'appareillage et les milieux, la conduite de l'essai et le calcul des résultats (p. 1609 et 1610). Quelques détails sont donnés comme par exemple le lavage spécial des tubes pour éliminer toute trace de détersif; la distribution des dilutions est conseillée avec l'usage d'une machine à répartir automatique, la lecture des résultats est préconisée avec l'usage d'un photolorimètre muni d'un écran approprié (vert en général). La réponse est enregistrée en densité optique, en % de lumière transmise ou en unités arbitraires, suivant le type d'appareil utilisé.

c) La *préparation des dilutions* est indiquée pour chaque monographie. Nous y renvoyons le lecteur intéressé.

d) *Conduite de l'essai et calcul des résultats* — Le principe est dans l'utilisation de 5 à 6 doses croissantes de solution étalon et de 3 doses croissantes de l'échantillon à titrer. Pour ces dernières, la répartition est faite en double ou même en triple. On utilise des témoins (milieux de culture non ensemencés et idem, mais ensemencés) destinés à permettre de suivre la croissance pendant l'incubation et de régler le photomètre. Très classiquement, à la fin de l'incubation, on plonge les tubes dans l'eau glacée et on introduit dans les tubes une goutte de soluté officinal de formaldéhyde du Codex. On traduit les résultats dans une courbe log dose-réponse. On calcule ainsi les moyennes des 2 ou 3 réponses obtenues pour chaque dose de l'échantillon à titrer, puisqu'ainsi qu'il a été dit ci-dessus, la répartition pour celui-ci est faite en double ou en triple. On lit alors par interpolation la dose d'étalon correspondant à la réponse obtenue pour chaque dose d'échantillon. On détermine alors, pour chaque dose de celui-ci, l'activité relative de l'échantillon par rapport à l'étalon et on calcule la moyenne des résultats obtenus. La Pharmacopée Française précise, par note en bas de page 1610, que :

« la courbe étalon est rarement une droite: si, dans une portion au moins, elle paraît définie par une droite, il est possible de calculer le titre et d'estimer la validité du titrage et les limites de confiance du résultat... »

Suivent les indications pour ces calculs (notes bas de page 1610 et 1611).

Le lecteur trouvera au Codex 1965, p. 1611, une liste des étalons fournis par le Laboratoire National de la Santé Publique. Cette liste est déjà ancienne puisqu'elle fut dressée en 1962. Depuis cette époque, le Laboratoire National de la Santé Publique fournit bien d'autres étalons pour les titrages d'antibiotiques. De plus, des pages 1611 à 1615, on peut prendre connaissance des formules de toutes les solutions préconisées par la Pharmacopée Française

pour les titrages d'antibiotiques, soit : les tampons, milieux de culture, avec la précision que le Laboratoire National de la Santé Publique indique les spécifications des substances des milieux, quand elles ne sont pas décrites dans le présent Codex. Il en est de même, comme il est précisé p. 1602, pour les disques en papier filtre utilisés pour le titrage par diffusion.

Nous indiquons maintenant la liste des antibiotiques figurant à la 8^e édition de la Pharmacopée Française (1965). Nous nous contenterons de dresser un bref inventaire des *essais demandés pour la partie biologique*. Le lecteur est prié de se reporter aux monographies du Codex (pour les détails) dont nous indiquons la pagination.

1) *Auréomycine* (chlor.) ou *Chlortétracycline* (chlor.) (p. 147).

a) *Essais généraux* : *Stérilité* (modifié au 1^{er} supplément 1968, dans le sens d'une simplification (cf. p. 1618) - *Pyrogènes* (cf. p. 1615) - *Toxicité* : sur 5 souris de 20 g, voie I.V., survie exigée au moins 48 heures. En cas de quelque léthalité, refaire l'essai, exigence d'une survie à 100 % en 48 heures.

b) *Titrage* : Au choix, soit méthode de diffusion avec spores de *Bacillus cereus*, soit méthode turbidimétrique avec *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P.

2) *Bacitracine* (p. 157).

a) *Essais généraux* : *Stérilité* (cf. p. 1618) - *Pyrogènes* (cf. p. 1615) - *Histamine* (cf. p. 1622) - *Toxicité* sur 5 souris 20 g, voie I.V., survie exigée au moins 48 heures, en cas de la moindre léthalité ou intoxication, refaire l'essai sur 10 souris, exigence d'une survie à 100 % en 48 heures.

b) *Titrage* : Au choix, soit méthode de diffusion avec *Micrococcus flavus* ATCC 10240, soit méthode turbidimétrique avec *Micrococcus pyogenes, aureus*, ATCC 10537.

3) *La série des Pénicillines*.

a) *Benzylpénicillines* ou *Pénicillines G cristallisées* (p. 179).

Il s'agit ici de la monographie générale des Pénicillines, où est donnée la définition, l'expression chiffrée de leur activité antibiotique et la définition de leur titre. L'activité réglementaire française est exprimée en U.I. correspondant à l'activité antibiotique de 0,6 µg de l'étalon international de benzylpénicillinate de Na.

b) *Benzylpénicillinate de K* (p. 180).

Essais généraux : *Stérilité* en présence de Pénicillinase (cf. p. 1618) - *Pyrogènes* (cf. p. 1615) - *Toxicité souris* : 5 souris 20 g, voie I.V., absence signe d'intoxication pendant 48 heures. Sinon, refaire l'essai sur 10 souris. Exigence d'une survie après 48 heures.

Essai spécial : *Stabilité à la chaleur*. Pas de perte supérieure à 10 % après 4 jours d'étuve à 100°. Application d'une formule donnée p. 184.

Titrage : Soit au choix : diffusion avec *Micrococcus pyogenes aureus* ATCC 6538 P, ou turbidimétrie avec même germe mais référence ATCC 9144.

c) *Benzylpénicillinate de Na* (p. 181) : On effectue les essais de toxicité sur la souris, d'activité antibiotique, de recherche des substances pyrogènes, de stabilité à la chaleur, de stérilité comme il est indiqué ci-dessus.

d) *Benzathine-Pénicilline* (p. 172).

Essais généraux : Stérilité (cf. p. 1618) mais avec une méthode longuement décrite p. 891, en utilisant l'acide thioglycolique - *Pyrogènes* (cf. p. 1615) - *Toxicité* : 5 souris 20 g, voie I.V. Pas de léthalité en 48 heures. Sinon refaire l'essai. Exigence d'une survie totale 48 heures.

Titrage : Au choix diffusion ou turbidimétrie en utilisant des dilutions décrites p. 891, et en se reportant aux techniques générales (p. 1601). Pas d'indication de germes.

e) *Benzylpénicillinate de procaïne* (p. 889).

Essais généraux : *Stérilité* : après inactivation par pénicillinase, essai particulier décrit p. 891 et vérification de la valeur des milieux de culture par Staphylocoque 209 P. - *Pyrogènes* (cf. p. 1615) - *Toxicité* : 5 souris 20 g, voie I.V., pas de léthalité en 48 heures, sinon refaire, exigence survie 48 heures.

Titrage : cf. ci-dessus Benzathine-Pénicilline.

f) *Phénoxyéthylpénicilline* (p. 800) : Seul un titrage biologique est exigible au Codex cf. Benzylpénicilline (p. 183) en prenant un étalon de phénoxyéthylpénicilline.

4) La série des *Chloramphénicols*.

a) *Chloramphénicol* (p. 275) : absence totale de contrôle biologique exigible au Codex. A noter qu'il n'en est pas de même dans les préparations galéniques contenant cet antibiotique.

b) *Palmitate de chloramphénicol* (p. 277). Idem.

5) La série des *Erythromycines*.

a) *Erythromycine* (p. 406).

Toxicité aiguë sur Souris : 10 souris 20 g, voie S.C., survie d'au moins 50 % en 48 heures, sinon refaire l'essai, mêmes exigences.

Titrage : Turbidimétrie avec *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 ou 9997.

b) *Propionate d'Erythromycine* (p. 409) cf. ci-dessus, mais l'essai sur la souris se fait par *tubage gastrique*.

c) *Stéarate d'Erythromycine* (p. 411) cf. propionate, ci-dessus.

6) *Sulfate de Framycétine.*

Essais généraux : Stérilité (cf. p. 1618) - *Histamine* (p. 1622) (tolérance < à 30 µg/g) - *Pyrogènes* (p. 1615) - *Toxicité Souris* 10 souris 20 g, voie I.V., en 10 secondes, mortalité en 48 heures < à 50 %.

Titrage : soit diffusion avec *Bacillus subtilis* (spores) ATCC 6633, soit turbidimétrie avec *Klebsiella pneumoniae* ATCC 9997 et ATCC 10031.

7) *Novobiocine monosodique* (p. 743).

Essais généraux : Stérilité : inscrit au supplément 1968 (cf. p. 1618).

Titrage : par diffusion avec *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ou par turbidimétrie avec *Micrococcus aureus* ATCC 6538 P.

8) *Nystatine* (p. 746) : c'est, bien entendu, un antifongique.

Toxicité Souris : 5 souris 20 g, voie I.P. avec une suspension dans la gomme arabique ; pas de léthalité en 48 heures. Sinon, refaire sur 10 souris ; survie exigée pendant et après 48 heures.

Titrage de l'action antifongique par diffusion ou turbidimétrie avec *Saccharomyces cerevisiae*. La préparation des solutions et des dilutions est modifiée au supplément 1968, p. 68.

9) *Sulfate de Néomycine* (p. 721).

Essais généraux : Stérilité (cf. p. 1618) - *Pyrogènes* (p. 1615) - *Histamine* (cf. p. 1622) Tolérance de 33 µg/g. - *Toxicité aiguë souris*, 5 souris 20 g, voie I.V., absence intoxication dans les 48 heures. Sinon, refaire l'essai sur 10 souris, survie exigée de 48 heures.

Titrage : soit diffusion, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, soit turbidimétrie, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031.

10) *Spiramycine* (p. 1102).

Toxicité Souris, cf. auréomycine p. 148 (5 souris, voie I.V., survie 48 heures).

Titrage : soit diffusion *Bacillus subtilis* (spores) ATCC 6633, soit turbidimétrie. *Staphylococcus aureus* ATCC 6358 P.

11) *Les Streptomycines.*a) *Sulfate de Streptomycine* p. 1107.

Essais généraux : Stérilité (cf. p. 1114) c'est-à-dire suivant la préparation très complexe indiquée pour l'auréomycine utilisant le kaolin, mais modifiée au supplément 1968. Pratiquement on se sert des membranes filtrantes, bien que cela ne figure pas en fait au Codex. - *Pyrogènes* (cf. p. 1615) - *Histamine* (cf. p. 1622) - Tolérance 33 µg/g. - *Toxicité* : sur 10 souris 20 g, voie I.V., survie d'au moins 50 % en 48 heures. Sinon, refaire l'essai et survie 50 % au minimum exigée.

Titration : soit diffusion, *Bacillus subtilis* (spores) ATCC 6633, soit turbidimétrique, *Klebsiella pneumoniae* sensible à la Streptomycine.

b) *Sulfate de Dihydro-Streptomycine* (p. 1111).

Essais généraux : *Stérilité* (cf. ci-dessus) - *Pyrogènes* (cf. 1615) - *Histamine* (cf. p. 1622) Tolérance 33 µg/g. - *Toxicité Souris* : 5 souris 20 g. voie I.V., 50 % au moins de vivantes après 48 heures. *Sinon refus du loi.*

Titration : soit diffusion (cf. ci-dessus), soit turbidimétrie avec *Klebsiella pneumoniae* sensible à la D.H.S.

12) *Les Oxytétracyclines.*

a) *Terrafungine* (ou *Oxytétracycline*) (p. 1193). Une seule obligation d'ordre biologique : le *titrage* (cf. auréomycine p. 149) en utilisant bien entendu un étalon de terrafungine, c'est-à-dire soit diffusion avec spore de *Bacillus cereus*, soit mieux, turbidimétrie avec *Klebsiella pneumoniae* PC 1 602.

b) *Chlorhydrate de Terrafungine* (ou d'oxytétracycline) (p. 1195).

Contrôle de stérilité (cf. p. 1618) inscrit au supplément 1968.

Titration (cf. ci-dessus).

13) *Les Tétracyclines.*

a) *Tétracycline* (p. 1205).

Toxicité aiguë Souris (cf. auréomycine) c'est-à-dire 5 souris 20 g., voie I.V., survie exigée au moins 48 heures, etc.

Titration : soit diffusion avec *Bacillus cereus*, var. *mycoides* ATCC 9634, soit turbidimétrie avec *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P.

b) *Chlorhydrate de tétracycline* (p. 1207).

Essais généraux : *Stérilité* : il est décrit le nombre de prélèvements à faire et cf. auréomycine (voir plus haut) - *Pyrogènes* (cf. p. 1615) - *Toxicité* sur souris (cf. auréomycine) c'est-à-dire 50 souris 20 g. voie I.V., survie exigée au moins 48 heures etc.).

Titration : soit diffusion *Bacillus cereus*, var. *mycoides* ATCC 9634, soit turbidimétrie *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P.

14) *Tyrothricine* (p. 1251) : Une unique exigence biologique : le *titrage* microbiologique, par turbidimétrie avec *Streptococcus faecalis* ATCC 10541.

Ainsi, 25 antibiotiques sont-ils inscrits à la Pharmacopée Française 1965.

La Pharmacopée Française indique les titres minima que doivent présenter les antibiotiques en France. En voici la liste, par rapport aux étalons internationaux de l'O.M.S., soit par rapport à des étalons nationaux, soit par rapport à des produits de référence français.

TABLEAU II.

NOM DE L'ANTIBIOTIQUE	TITRE AU CODEX FRANÇAIS au minimum par mg	TITRE ETALON par mg	REFE- RENCE
Auréomycine (chlorhydrate) .	950 µg de chl. d'auréomy- cine étalon	1.000 µg d'acti- vité	E.I.
Bacitracine	50 U.I. .	55 U.I.	E.I.
Benzylpénicillinate de K . .	1.515 U.I.	1.595 U.I.	E.I.
Benzylpénicillinate de Na .	1.580 U.I.	1.667 U.I.	E.I.
Benzathine pénicilline . . .	1.100 U de B. Pénic. de Na par mg de produit sec		
Benzylpénicillinate de Pro- caïne	950 U.I. de B. Pénic. de Na par mg de produit sec		E.I.
Phénoxyéthylpénicilline . .	1.560 U.I.	1.695 U.I.	E.I.
Chloramphénicol	pas de titrage biologique. En chlore total 21,7 à 22,2 %	1.000 µg d'acti- vité	E.I.
Chloramphénicol (palmitate)	pas de titre inscrit		
Erythromycine	850 µg de base	950 µg de base	E.I.
Erythromycine (propionate).	850 µg de base		E.I.
Erythromycine (stéarate) . .	600 µg de base		E.I.
Framycétine (sulfate)	600 µg d'étalon	Le sulfate de Fra- mycétine est étalonné en ba- se étalon	P.R.F.
Novobiocine	890 µg de Novobiocine acide		P.R.F.
Nystatine	2.000 U. Nationales		N.
Néomycine (sulfate)	625 U.I.		E.I.
Spiramycine	2.700 U. Nationales		N.
Streptomycine (sulfate) . . .	715 µg de base	780 µg de base	E.I.
Dihydrostrepto. (sulfate) . .	725 µg de base	760 µg de base	E.I.
Terrafungine	90 % d'activité par rapport à la Terrafungine base anhydre	900 µg d'activité	E.I.
Terrafungine (chlorhydrate) .	Idem		E.I.
Tétracycline	975 µg de chl. de tétracy- cline par mg de produit sec	990 µg d'activité	E.I.
Tétracycline (chlorhydrate) .	900 µg de chl. de tétracy- cline par mg de produit sec		E.I.
Tyrothricine	90 % de l'étalon National		N.

E.I. = Etalon international ; N = Etalon national ; P.R.F. = Produit de référence français.

Avant de terminer ce chapitre des antibiotiques, il convient d'évoquer un problème qui n'est pas traité par la Pharmacopée, mais qui est dans les préoccupations des Services Officiels de Contrôle Français : c'est celui du titrage des mélanges d'antibiotiques. L'intérêt du dosage bactériologique est de mettre en évidence, non pas seulement la teneur d'une substance en molécules chimiques antibiotiques, mais l'activité propre antimicrobienne des composants du produit à expertiser, sur des germes vivants. La connaissance d'un tel pouvoir étant non seulement indispensable pour apprécier l'activité thérapeutique d'une substance, mais aussi pour connaître son comportement au sein d'une formule galénique et son temps de péremption.

Conséquences analytiques de l'association d'antibiotiques.

Deux cas sont à considérer :

a) Il n'existe aucune interférence nuisible entre les méthodes de titrage, et chaque antibiotique peut alors être dosé chacun de son côté, par des titrages spécifiques qui ne sont pas troublés les uns par les autres.

b) Les techniques interfèrent entre-elles et le contrôleur doit éliminer ces causes de trouble. A notre avis, on doit dissocier les *interférences vraies* des *interférences relatives*.

A. — *Interférence vraie.*

a) *Interférence réciproque.* — Chacun des antibiotiques interfère dans le titrage de l'autre, en troublant les résultats, quels que soient la méthode et le germe-test utilisés.

Un exemple peut être trouvé avec le mélange Pénicilline plus Auréomycine.

b) *Interférence non réciproque.* — Dans ce cas, l'un des antibiotiques seulement gêne le titrage d'un ou des autres en intervenant dans l'action sur le germe-test.

Exemple 1. — Pénicilline avec Bacitracine. La Pénicilline trouble le dosage de la Bacitracine par la technique de diffusion avec *Micrococcus flavus* ATCC 10240. Mais la Bacitracine ne gêne pas la Pénicilline dans le dosage de celle-ci, par diffusion avec *Micrococcus pyogenes aureus* ATCC 6538 P.

Exemple 2. — Néomycine plus Polymyxine B. La Néomycine gêne le dosage par diffusion de la Polymyxine B. Mais la Polymyxine n'interfère pas dans le dosage de la Néomycine par diffusion avec *Micrococcus pyogenes aureus*.

B. — *Interférences relatives.*

Les principaux cas existants peuvent être trouvés dans une interaction spécifique d'un des éléments de la technique (méthode de titrage, usage du germe-test, variation de concentration de l'antibiotique) ou dans des actions inhibitrices ou exaltantes non inhérentes aux techniques (par exemple action due à d'autres antibactériens chimiques existant dans la formule, excipient particulier, etc.).

a) Influence de la méthode de dosage et du germe mis en oeuvre.

Exemple : Néomycine associée à la Streptomycine. La Néomycine gêne le dosage de la Streptomycine par turbidimétrie avec *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, mais ne le gêne pas par diffusion avec *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

b) Influence des concentrations respectives des antibiotiques sur leur titrage.

Dans ce cas, le fabricant en accord avec le thérapeute, a établi un rapport entre deux ou plusieurs antibiotiques pour une formule donnée. Mais sur le plan analytique ces proportions troublent le titrage bactériologique et il convient de les modifier artificiellement.

c) Influence des autres composants de la formule sur le titrage.

C'est principalement le cas d'autres antibactériens proprement dits, ou d'ajuvants.

Exemples : Sulfamides à fortes concentrations.

Excipients, qui par exemple, modifient la diffusion de l'antibiotique en gélose.

Les possibilités d'élimination des interférences peuvent être multiples. On peut mettre en oeuvre des moyens physiques, chimiques, ou bien des techniques purement bactériologiques. Il n'est pas possible d'entrer ici dans les détails. Le lecteur que cette question intéresse pourra se reporter à la *Revue d'Immunologie (Paris)* 1968, **32**, p. 161 à 173. Nous nous contenterons de donner ici une simple liste de ces moyens.

1. — *Moyens Physico-chimiques.*

1. Elimination des interférences par usage des solvants.
2. Extraction et séparation des antibiotiques par chromatographie.
3. Inactivation de l'un ou de plusieurs antibiotiques par usage d'enzymes, de produits chimiques, de modification des conditions physiques du titrage.

2. — *Moyens microbiologiques.*

1. Emploi de souches rendues résistantes à l'un ou plusieurs antibiotiques du mélange.

2. Modification de la sensibilité de l'un ou plusieurs antibiotiques du mélange (abaissement du seuil de sensibilité par dilution du mélange, changement de méthode — remplacer la diffusion par la turbidimétrie ce qui sensibilise toujours le titrage —, modifier certains points des techniques — pH, solution tampon, germes utilisés, etc. — Utilisation d'une gamme-étalon préparée avec le mélange d'antibiotique considéré, mais c'est là une solution d'exception).

3. — *Moyens mixtes.*

1. Recours au mélange de méthodes chimiques pour doser les uns, et bactériologiques pour titrer les autres.

2. Combinaison de divers moyens d'extractions et de dosages.

On ne peut que souligner la complexité de ces problèmes et insister sur le fait qu'aucune réglementation ne permet d'établir des règles générales permettant de leur trouver une solution immédiate et passe-partout. Le dosage séparé de chacun des antibiotiques composant un mélange apparaît comme soulevant pratiquement chaque fois un cas particulier.

CHAPITRE V.

TITRAGES ET CONTROLES DIVERS

Ce dernier chapitre, consacré aux autres substances soumises à un titre quelconque au contrôle biologique, contient les produits suivants :

- a) Vitamines.
- b) Drogues végétales.
- c) Médicaments tirés du règne animal (hormones, opothérapie, etc).
- d) Produits chimiques divers.
- e) Réactifs biologiques.
- f) Matériels divers (produits à usage chirurgical, matières plastiques, seringues et aiguilles stériles, etc.).

Bien entendu, nous nous contenterons d'un exposé très bref des modalités du contrôle biologique français, renvoyant le lecteur pour de plus amples détails au texte même du Codex, les pages de référence sont indiquées pour chaque produit.

A. — *Vitamines ou substances douées d'activité vitaminique.*

Trois produits de ce type existent au Codex 1965.

1) *Extrait de foie* (p. 459) (Vitamine B₁₂). — Il est soumis à 2 essais biologiques. Titrage de l'activité B₁₂ et vérification d'absence de substances histaminiques. Pour ce dernier point cf. p. 1622. L'activité B₁₂ se titre suivant la technique microbiologique classique.

2) *Huile de foie de Morue* (p. 575). — Le contrôle biologique a trait au dosage de la vitamine A sur le rat. On travaille sur le jeune rat carencé dont on étudie la courbe de poids sous l'influence de l'huile.

3) *Vitamine A* (p. 1284). — Le Codex exige un dosage biologique sur le jeune rat carencé basé sur la comparaison des courbes de poids. Il est indiqué dans l'article le moyen de procéder au calcul des limites d'erreur.

B. — *Drogues végétales.*

Six produits de ce type sont soumis par la Pharmacopée Française à des contrôles biologiques.

1) *Racines d'Aconit napel* (p. 63). — Soumis à un essai de toxicité aiguë sur la Souris.

2) *Teinture d'Aconit* (p. 1171). — Essai de toxicité aiguë, cf. ci-dessus.

3) *Digitale* (feuilles) (p. 374). — On pratique un titrage biologique par étude de l'activité cardiotoxique sur animal (choix très ouvert sur Cobaye, Grenouille, Chien, Chat). Comparaison de l'activité enregistrée avec un étalon.

4) *Poudre de Digitale* (p. 868).

5) *Teinture de Digitale* (p. 1176).

Ces deux derniers produits galéniques étant soumis à un titrage biologique d'activité semblable à celui décrit ci-dessus.

6) *Graine de Strophantus* (p. 1117). — La Pharmacopée exige un titrage biologique sur le Cobaye (activité cardiotoxique) tel qu'il est décrit à l'article Digitale (cf. ci-dessus).

C. — *Produits d'origine animale*

(Substances opothérapiques, hormones, enzymes, etc.).

Plus d'une quinzaine de produits sont tributaires d'un essai biologique à un titre quelconque.

1) *Hormone adrénocorticotrope* (A.C.T.H.) (p. 66). — Divers contrôles sont inscrits - *Substances histaminiques* (pratiquement absence) - *Essai de*

toxicité sur la souris et un *titrage biologique* sur la surrénale du rat privé d'hypophyse. Essai d'activité corticotrope, p. 67. Essai limite pour la Vasopressine et l'Ocytocine.

2) *Soluté injectable d'A.C.T.H.* (p. 1061). — Il est soumis aux contrôles généraux des solutés injectables : Stérilité, innocuité. En plus, *titrage de l'activité corticotrope* sur la surrénale de rats privés d'hypophyse (cf. ci-dessus) et divers *essais limite* des taux tolérables en Vasopressine, Ocytocine et Histamine.

3) *Chymotrypsine* (p. 294). — Le contrôle biologique a trait aux points suivants : pratiquement absence de *substances histaminiques* (cf. p. 1622), vérification de l'*activité trypsique limite* par étude de l'action sur un substrat spécifique (ester éthylique du N benzoyl-L-arginine), et enfin titrage de l'activité enzymatique proprement dite sur un ester éthyl N-acétyl L-tyrosine.

4) *Extrait de foie* (p. 459). — Déjà cité au chapitre précédent (cf. Activité B₁₂ et recherche substances histaminiques).

5) *Fibrinogène humain sec* (p. 482). — Il est soumis aux essais généraux des produits de ce type - *Toxicité* (sur souris ou cobayes, voie I.V., surveillance 7 jours) - *Stérilité* (cf. p. 1618) - *Pouvoir pyrogène* (cf. p. 1615) et à des essais particuliers : titrage du Fibrinogène coagulable sous l'action coagulante de la thrombine.

6) *Les deux gonadotrophines inscrites au Codex* (2 inscriptions, plus une monographie générale) :

— Gonadotrophine du lobe postérieur d'hypophyse (p. 542) — Généralités.

— Gonadotrophine chorionique (extraite de l'urine de femme enceinte) (p. 543).

— Gonadotrophine sérique (extraite du sérum de jument pleine) (p. 546).

Page 542, sont exposées les généralités sur les gonadotrophines. Les contrôles biologiques sont communs à toutes les gonadotrophines. Soit : Contrôle de stérilité (cf. p. 1618), du pouvoir pyrogène qui est ici l'objet d'une *méthode particulière* pour celle extraite de l'urine de femme, mais pour l'essai de celle du sérum de jument, il s'agit de l'épreuve classique (cf. p. 1615), et d'un dosage biologique de l'activité gonadotrophique :

a) pour la chorionique (urine de femme) la Pharmacopée utilise la technique de l'augmentation des vésicules séminales du Rat :

b) pour la sérique (sérum de jument), celle de l'action sur les ovaires de Rattes.

7) *Héparine* (p. 559). — Les essais biologiques sont les suivants :

Contrôles généraux : absence de pouvoir pyrogène et pratiquement de substances histaminiques.

Titrage d'activité : par étude de l'activité anticoagulante sur du plasma de mouton.

8) *Chlorhydrate d'histidine* (p. 570). — L'essai biologique décrit est une simple recherche de l'activité histaminique (cf. p. 1622).

9) *Huile de foie de Morue* (p. 575). — Déjà décrit plus haut (dosage vitamine A).

10) *Hyaluronidase* (p. 586). — Les contrôles biologiques sont représentés par des *essais généraux* classiques - *Stérilité* (cf. p. 1618) et absence de pouvoir pyrogène (cf. p. 1615), et un *titrage d'activité* fait sur sérum frais de cheval et coagulation avec extrait de cordon ombilical (étude de la diminution du trouble dû à la coagulation du sérum par action de l'enzyme).

11) *Insuline* (p. 602). — Le titrage biologique est, bien entendu, exigé par étude de l'abaissement du taux de la glycémie du Lapin (dosage par la méthode au ferri-cyanure).

12) *Soluté injectable d'insuline* (p. 1069). — Le Codex demande divers essais biologiques - *Stérilité* (cf. p. 1618), contrôle de la toxicité sur Lapin (six lapins traités par l'insuline, voie sous-cutanée, reçoivent du glucose par voie I.V. On étudie la cessation des convulsions et on surveille le comportement des animaux pendant 3 jours. Ils doivent rester en vie) et, enfin, un titrage d'activité (cf. monographie insuline p. 603).

13) *Suspensions injectables d'insuline*. — Quatre produits sont inscrits à la Pharmacopée Française :

Soluté d'insuline-zinc amorphe (p. 1154)

Soluté d'insuline-zinc cristallisé (p. 1156)

Soluté d'insuline-zinc mixte (p. 1158)

Soluté d'insuline-protamine-zinc (p. 1160)

Les contrôles biologiques demandés sont sensiblement les mêmes pour ces quatre produits - *Stérilité* (cf. p. 1618) - *Toxicité sur le Lapin* (cf. article précédent p. 1069) - *Dosage de l'insuline* (sur le Lapin, cf. article insuline p. 603). Pour le dernier soluté signalé ci-dessus (I.P.Z. p. 1160), la Pharmacopée demande un essai sur le liquide surnageant après centrifugation, afin d'y vérifier l'absence d'effet hypoglycémiant.

14) *Poudre de lobe postérieur d'hypophyse* (p. 375). — Comprend parmi ses essais un titrage biologique des unités ocytociques (cf. ci-dessous).

15) *Soluté injectable de lobe postérieur d'hypophyse* (p. 1071), pour lequel la Pharmacopée Française demande :

a) des contrôles généraux (Stérilité cf. p. 1618 et absence de substances histaminiques cf. p. 1073) ;

b) un titrage d'ocytocine (action sur la corne utérine de ratte adulte en oestrus par provocation des contractures).

16) *Préparation injectable d'extrait de foie* (p. 883), qui nécessite les essais suivants :

a) *Contrôles généraux* (essais de Stérilité cf. p. 1618, des substances histaminiques cf. p. 1622, et absence de substances pyrogènes cf. p. 1615) ;

b) un titrage de l'activité vitaminique B₁₂ (dosage avec *Escherichia coli* B₁₂ sensible ATCC 11105).

17) *Soluté injectable de parathyroïde* (p. 1078), doit subir un essai d'activité sur le chien normal, par recherche de la dose du soluté qui provoque une élévation de Ca sérique. A cette occasion, la Pharmacopée française indique la précision suivante :

les animaux devront être habitués à la ponction veineuse et être au repos expérimental au moins quatre semaines avant l'essai.

18) *Trypsine* (p. 1240). — Comprend deux essais biologiques : contrôle des substances histaminiques, et vérification de l'activité enzymatique.

D. — Produits chimiques divers

1) *Tubocurarine* : On peut estimer qu'il comporte un titrage d'activité curarisante sur le lapin bien qu'il ne figure pas à la monographie (p. 1248), mais il est évoqué p. 1631, dernier paragraphe, 3^e ligne.

2) *Novarsenobenzol* (p. 717) : Comporte deux essais biologiques :

a) Toxicité aiguë sur la souris qui comporte une extrême précision (cf. p. 719) ;

b) vérification de l'activité trypanocide ;

3) *Suramine sodique* (p. 1152) : Nécessite la détermination de la toxicité aiguë sur la souris par voie I.V. ;

4) *Thiocolchicoside* (1968 p. 97) : Comporte une recherche des substances pyrogènes.

E. — Produits réactifs.

Un certain nombre de substances réactogènes d'origine et de contrôle biologique figurent au Codex de 1965. En voici la liste.

1) *Allergènes* (p. 85). — Il s'agit là de produits particuliers, parce que le sujet sur lequel on doit faire la réaction est l'homme lui-même. C'est

là la seule exception à l'attitude française qui élimine toujours les essais sur l'humain. Le Codex, en ce qui concerne ces produits, indique :

« L'activité... (se détermine) par réaction cutanée chez un même sujet allergique... par comparaison... avec une préparation d'allergènes d'activité connue ».

2) *Antigène méthylique tuberculeux* (p. 125). — Comporte les contrôles biologiques suivants :

a) *Essais généraux : Stérilité* (cf. p. 1618), *innocuité* par injection à 2 cobayes de 300 g, de 5 ml de l'antigène (voie S.C.) et surveillance 7 jours.

b) *Titrage de l'antigénicité* par réaction de fixation du complément (après titrage du complément) sur sérum de cheval ayant reçu des B.K. humains ou bovins.

3) *Malléine* (p. 666). — Il s'agit d'un extrait de bacille de la Morve pour lequel aucun contrôle n'est réclamé par la Pharmacopée française.

4) *Toxine diphtérique diluée* (p. 1232). — Il s'agit d'une solution de toxine diphtérique stabilisée en tampon boraté, telle que 0,1 ml de cette dilution correspond au 1/50^e de la D.M.M. en 4 jours pour un cobaye de 250 g. Le Codex spécifie que cette préparation est utilisée pour l'I.D.R. de Schick à raison de 0,1 ml de cette solution qui, en l'absence de toute réaction locale, témoigne d'un taux d'au moins 1/30 d'U.A. diphtérique, taux reconnu comme seuil de l'immunité anti-diphtérique. Cette préparation comporte :

a) un essai de stérilité (cf. p. 1618) ;

b) une vérification biologique sur Cobaye. On pratique une I.D.R. de 0,1 ml de la toxine diluée associée à 1/750^e d'unité antitoxique diphtérique sous un volume total de 1 ml sous la peau de l'animal. On ne doit pas observer de réaction locale.

c) un véritable titrage biologique sur le Cobaye. Il est en effet spécifié que l'injection intra-dermique, chez le cobaye, d'une dose de 0,1 ml de toxine diluée mélangée à une dilution d'une unité antitoxique au 1/1250^e sous un volume de 0,1 ml, doit être suivie d'une réaction locale du type de l'I.D.R. spécifique positive observée chez l'homme.

5) *Tuberculine brute* (p. 1244). — Le Codex de 1965 exige les essais biologiques suivants - *Contrôle de stérilité* (cf. p. 1618), *d'innocuité* chez le Cobaye, vérification de *non sensibilisation* du cobaye et *titrage* de l'activité tuberculinique. Celui-ci se fait sur des cobayes sensibilisés au B.K. vivant et comporte :

a) un titrage préliminaire ;

b) un titrage définitif. Il s'agit dans les deux cas d'un titrage biologique type log dose-réponse avec construction de deux droites parallèles, etc.

La Pharmacopée Française précise que la tuberculine brute doit titrer au ml entre 100.000 U.I. et 125.000 U.I.

6) *Tuberculine purifiée* (p. 1247). — L'essai est semblable au précédent et comporte, bien entendu, un titrage. La tuberculine purifiée doit contenir au moins $2,5 \times 10^4$ U.I. par milligramme.

F. — *Matériels divers.*

1) *Matériel à usage chirurgical.* — Il comporte des substances et matériels divers, tous soumis au contrôle de la stérilité classique (cf. p. 1618). On trouve les produits suivants :

Catguts chirurgicaux, p. 261.

Crins chirurgicaux, p. 337 et crins synthétiques, p. 339.

Fils pour ligatures chirurgicales, p. 484. Chez ceux-ci, l'épreuve de stérilité se fait sur des témoins de fabrication.

Fils de lin chirurgicaux, p. 486.

Fils synthétiques, p. 488.

Laminaires chirurgicaux, p. 628.

Objets de pansements stériles, p. 749.

Ouate cellulose chirurgicale et ouate visqueuse hydrophile chirurgicale, p. 758 et p. 760.

Soies tressées chirurgicales, p. 1039 (cocon de ver à soie).

2) *Matériel entrant dans la composition d'objets destinés à servir de récipient pour injection parentérales.* — On peut placer sous cette rubrique les objets ou matériaux suivants :

a) *Seringues en matières plastiques et aiguilles délivrées stériles* (p. 124 du 1^{er} supplément 1968).

Ce matériel est soumis à un contrôle particulier de stérilité qui a été étudié plus haut au chapitre « Stérilité ».

b) *Bouchons pour fioles à injections multiples* (p. 1397). — Ce matériel est soumis à un contrôle d'absence de matières pyrogènes (voir plus haut au chapitre « Pyrogène »).

c) *Matières plastiques* : (p. 1395, alinéa 6^o). — Ces produits sont soumis, après une préparation spéciale (exposée plus haut, voir chapitre « Pyrogène »), à un contrôle d'absence de pouvoir pyrogène et à un contrôle de toxicité sur souris.

CHAPITRE VI.

QUELQUES PROBLEMES PARTICULIERS POSES PAR L'UTILISATION
DU CONTROLE BIOLOGIQUE

Les problèmes posés par le contrôle biologique sont nombreux et complexes. Nous avons eu l'occasion d'en souligner un certain nombre dans l'introduction de ce travail et dans les différents chapitres précédents. Ces problèmes sont divers, ils ont trait principalement à l'organisation du contrôle proprement dit, sur le plan administratif d'abord, sur le plan technique ensuite. Nous pensons qu'il était digne d'intérêt de les exposer ici rapidement.

A. — *Organisation du contrôle sur le plan administratif.*

Une analyse de contrôle biologique n'est pas tellement différente d'un examen relevant de la pathologie clinique. Là aussi, les points principaux sont l'organisation du prélèvement, l'exécution technique analytique, la lecture des résultats, leur interprétation et l'exploitation légale de ceux-ci.

La partie administrative comporte la mise en place du prélèvement, sa réception dans le respect des voies légales, sa transmission aux services techniques, la réception du résultat analytique et son exploitation réglementaire.

Ces conditions sont remplies, en ce qui nous concerne, par l'articulation qui existe en France entre l'administration centrale du Ministère des Affaires Sociales (Santé Publique) et le Laboratoire National de la Santé Publique. Au Ministère, c'est le Service Central de la Pharmacie et des Médicaments qui est compétent en la matière.

B. — *Organisation du contrôle sur le plan technique.*

Au point de vue technologique, le contrôle des produits biologiques comporte divers impératifs :

- a) la sélection et l'entretien des souches vivantes ;
- b) la sélection, le titrage et la conservation des étalons ;
- c) l'interprétation statistique des résultats ;
- d) les normes techniques des titrages biologiques.

a) Le premier point est dominé par la génétique et une connaissance approfondie de la notion des « souches ». En gros, leur sélection s'effectue sur deux plans :

- a1) protistes et a2) animaux.

a1) Les protistes sont surtout représentés par les bactéries et les virus. Nous limiterons nos quelques réflexions aux bactéries qui sont d'un emploi journalier pour le contrôle des antibiotiques et de quelques vaccins.

En ce qui concerne les antibiotiques : les études relatives aux germes intéressent particulièrement les détails suivants :

a) Recherche et sélection des germes sensibles et résistants aux antibiotiques isolés ou associés, avec notamment travaux sur les seuils de sensibilité ou de résistance.

b) Étude complète des possibilités de dosage avec des germes divers comportant des gammes, d'abord des antibiotiques associés (2 par 2 en cas de mélange binaire, puis en associations variées en cas de mélange plus polyvalent), puis des antibiotiques seuls, afin d'apprécier l'interférence éventuelle aux taux de dilutions utilisées dans chaque méthode proposée.

c) Quête du germe ayant le maximum de qualité, puis sélection des souches soit pour les titrages des antibiotiques isolés, soit convenable pour des mélanges d'antibiotiques, étude de la physiologie et de son comportement dans le temps. Un tel germe doit être non seulement à la fois sensible à l'antibiotique que l'on se propose de doser et résistant à l'autre, mais doit être susceptible de posséder la meilleure sensibilité différentielle entre les concentrations antibiotiques choisies pour le titrage.

Cas des sélections de souches rendues résistantes en vue du contrôle de mélange d'antibiotiques.

C'est la méthode la plus élégante et la plus sûre pour le laboratoire de contrôle bactériologique, mais elle est difficile à mettre en oeuvre et surtout longue. Elle est basée sur une connaissance approfondie de la physiologie des germes, en particulier en ce qui concerne les modalités de leur reproduction et de la transmission des caractères héréditaires.

On peut utiliser divers moyens pour obtenir des souches spécifiquement résistantes : soit les rendre soi-même résistantes au laboratoire, soit chercher dans la nature (produits pathologiques ou autres) ou dans les collections, des souches résistantes à ou aux antibiotiques intéressés.

Dans le premier cas, il ne faut pas se dissimuler que la route sera longue et difficile. Il convient d'avoir recours à une technique spéciale permettant de rendre une souche résistante. L'une des meilleures semble bien être la méthode sur gélose (technique de Szybalski pour la sélection des mutants résistants).

On se heurte à la diversité des types de résistance dont il faut avoir une bonne connaissance. Il faut tenir compte, suivant les antibiotiques et les germes en présence des types suivants :

— Résistance dite à un échelon : type Streptomycine, obtenue d'emblée, forte (I).

— Résistance fractionnée, dite à plusieurs échelons, type Pénicilline, lente à obtenir, par palier faible au début (II).

— Résistance à type intermédiaire, relativement forte au départ, mais augmentant encore par paliers, séparés par des temps variables (III).

— Résistance à type réduit qui est tardive ou inexistante, très difficile à installer de façon définitive (IV).

Les tentatives de rendre soi-même une souche résistante présentent divers inconvénients, qu'il ne faut pas dissimuler.

— Essais fastidieux sur diverses souches avant d'en trouver une donnant satisfaction ;

— découragement devant les antibiotiques provoquant des résistances du type IV ;

— possibilité d'acquisition de résistances croisées ;

— nécessité de l'entretien des mutants résistants avec l'obligation de vérification périodique de la résistance et de la remise en place de celle-ci, le cas échéant.

Tout ceci entraîne, en pratique courante du laboratoire de contrôle, un très grand ralentissement de la réponse possible.

Dans le second cas, recherches de souches résistantes, dans les produits pathologiques, la nature ou les collections, on est obligé de se livrer souvent à une quête longue et fastidieuse, mais parfois couronnée de succès. Théoriquement, la stabilité de la résistance, en principe acquise depuis longtemps, est plus forte que pour les souches précédentes entraînées récemment, par définition.

Toutefois, il faut signaler l'existence de souches intéressantes pour leur résistance dans certaines collections publiques ou semi-publique (ATCC aux U.S.A., Institut d'hygiène de Lausanne, Institut Pasteur à Paris, National Institute of Health à Londres, etc.) ou privées (notamment chez les fabricants). Par exemple l'ATCC possède et délivre :

— *Micrococcus flavus* ATCC 10240 A, résistant à la Streptomycine et à la D.H.S., servant au dosage de la Bacitracine en présence de Streptomycine ou de D.H.S.

— *Micrococcus pyogenes aureus* ATCC 6538 PR, résistant à la Streptomycine et à la D.H.S., mais sensible à la Néomycine, etc. On pourrait citer bien d'autres exemples.

En ce qui concerne le contrôle des vaccins, notamment pour certain titrages d'activité, il est nécessaire parfois de procéder à la sélection de souches microbiennes d'un pouvoir pathogène reconnu. Tel est par exemple le cas du vaccin anticoquelucheux. Certes, il existe des souches de notoriété internationale, mais cela ne peut exclure la recherche personnelle.

La conservation de ces souches exige des soins particuliers. La pratique de la lyophilisation est une solution reconnue par tous. Parfois, notamment pour les souches servant au titrage des antibiotiques, il est suffisant d'envisager une conservation de courte durée entre les titrages. Une pratique utile est celle de l'utilisation des milieux semi-liquide, semi-solide.

Nous ne pouvons pas nous étendre plus longtemps ici sur ces détails particuliers.

a2) Le second point concerne les animaux de laboratoire. Tout titrage biologique étant conditionné par son support vivant : l'animal, celui-ci devra être l'objet d'une particulière attention quant à sa sélection, sa reproduction, son élevage, son environnement. Mais tout ceci est bien classique. Toutefois, nous voudrions attirer l'attention, en particulier dans le cas de titrages antigéniques, sur l'état immunologique des animaux. Tout a été dit ou presque sur les sujets de race pure, de type classique, sur ceux dits « *germes-free* » et sur ceux « *non-pathogens-free* ». Les contrôles réglementaires se font pratiquement sur des animaux type classique, sans précautions particulières quant aux germes qu'ils hébergent normalement dans leurs cavités anatomiques naturelles y compris leur intestin. Or, dans quelques cas, ceci a une importance capitale, car les germes et toxines (même très banales, comme les toxines des bacilles du genre *Proteus*) peuvent modifier considérablement leurs capacités réactogènes immunologiques. Certains auteurs proposent même d'inventorier la flore du tractus gastro-intestinal avant les titrages antigéniques.

Une précision encore concernant l'âge physiologique des animaux. Dire que l'on doit employer un animal de tel poids, revient dans l'esprit de certains expérimentateurs à utiliser un animal de tel âge. Or, cette notion n'est valable que si l'on sélectionne des animaux de souche pure dont on connaît parfaitement la courbe de croissance pour une nourriture, un environnement et un climat donnés (ou une région donnée). Du reste, il convient de souligner que pour certains contrôles d'innocuité ou titrages immunologiques, le poids adéquat de l'animal revient à sélectionner des sujet d'un âge plus ou moins éloigné du sevrage. Le fait d'utiliser des animaux d'un faible poids revient à retenir des animaux très jeunes, très proches du temps de sevrage et possédant une flore intestinale encore peu évoluée et un potentiel immuno-réactionnel d'un certain type. Modifier le poids revient à perturber cet équilibre et modifier peut-être les valeurs du contrôle. C'est là un fait important que ceux qui manipulent les contrôles biologiques doivent bien connaître.

Ceci est également valable pour les animaux destinés au contrôle de toxicité aiguë.

b) Le second point que nous désirons évoquer concerne les étalons biologiques. En complément de ce que nous avons abordé succinctement *in fine* au chapitre de l'introduction de ce travail (cf. Position du problème), nous voudrions exposer rapidement diverses notions qui intéressent le Contrôleur.

Avant d'être utilisés par voie réglementaire, les étalons doivent subir des essais de mesure d'activité par rapport aux réactions obtenues sur un organisme vivant lui-même sélectionné, sur lequel la substance considérée

comme étalon présente un effet spécifique reconnu. Ensuite, on doit se mettre d'accord sur une évaluation arbitraire d'une unité d'activité, définie par les experts « comme l'activité d'un poids donné d'une préparation unique de la substance destinée à devenir étalon ».

Mais il existe des limites à l'usage correct d'une unité d'activité.

— La relation directe entre l'étalon et la souche réactogène (virus, germes microbiens, animaux ou tissu vivant, etc.). Elle peut être variable suivant les régions et les saisons. En ce qui concerne les titrages d'antibiotiques ou de substances immunologiques, ceci peut aboutir à des titrages erronés et à certains désaccords entre fournisseurs et contrôleurs. Dans le cas de substances à actions physiologiques dangereuses ou sub-toxiques (vaccins divers vivants ou toxiques potentiels : anti-*pertussis* par exemple, ou insuline, ou digitale, ou alcaloïdes du curare), on peut même aboutir à la libération sur le marché de produits dangereux.

— La variation même de la valeur « unité d'activité » par suite d'évolution dans le temps des techniques de contrôle. Comme le disent les experts de l'O.M.S. :

« il n'est possible d'évaluer d'une façon sûre les différences de variabilité des souches et des techniques que si l'on compare leurs réactions à une unique préparation de la substance, il faut établir une préparation étalon de la substance suivant la méthode traditionnelle ».

Des règles générales doivent être scrupuleusement observées quant au bon usage des étalons. Par exemple les notions soulignées par certains, depuis longtemps, sont toujours d'actualité.

« L'indépendance de l'unité par rapport aux organismes réactogènes (animal, cellules, tissus, protistes, etc...) et à la pureté de la préparation implique la réalisation d'un certain nombre de conditions :

- a) La préparation étalon ne contient, en fait d'impureté, ni corps ayant une activité spécifique qui rappelle celle du principe actif, ni substance qui exalte ou contrarie son activité.
- b) La matière biologiquement active est homogène.
- c) La substance biologique titrée par comparaison avec l'étalon est identique à celle de l'étalon ».

Outre ces véritables truismes qu'il nous a semblé nécessaire de rappeler, l'organisation des contrôles biologiques entraîne, pour ce qui a trait aux étalons, un véritable service autonome qui a pour but essentiel :

1. La fabrication, ou tout au moins, la surveillance de la fabrication par des industriels spécialisés.
2. La sélection des meilleurs d'entre-eux au point de vue pureté et qualité de conservation (à la rigueur par la technique de conservation accélérée).
3. Leur titrage par rapport aux étalons internationaux en usage.

4. Leur répartition en unité de conditionnement, distribuable aux usagers (problèmes des récipients, du dosage de répartition, etc.).

5. Leur conservation dans les conditions idéales (par surveillance régulière du titre et composition chimique, analyses biologique et physico-chimique).

6. Leur distribution à ceux qui en font la demande et surveillance de leur usage pour éviter les abus.

Sont particulièrement intéressés par ces problèmes les services de titrage des antibiotiques, des sérums et vaccins, des drogues physiologiquement actives, etc.

c) L'exploitation statistique du résultat des titrages biologiques pose un certain nombre de questions. Si l'on exige une précision des dosages telle que les limites de confiance soient très serrées (telle qu'entre 95 et 105 %), il convient de pratiquer un très grand nombre de titrages et son exploitation nécessite souvent l'usage de machines et de calculateurs électroniques. Dans ces conditions, un service de contrôle biologique peut exiger une division de calcul statistique autonome dotée de ces puissants moyens, ce qui risque d'être financièrement hypertrophique. Une solution pratique est de tolérer, chaque fois que faire se peut, des limites de confiance un peu plus larges. De plus, on peut se demander quelle méthode sera utilisée : la méthode complète (qui nécessite une exploitation mécanique le plus souvent), ou une méthode approchée (comme le propose la Pharmacopée Française), ou encore un nomogramme adapté au type de dosage considéré.

Quoiqu'il en soit, l'interprétation des résultats et les calculs statistiques sont inséparables de l'analyse proprement dite. L'analyse statistique portera essentiellement sur les points suivants :

1. Analyse de variance au cours de la mise au point des méthodes. Par exemple la détermination de la meilleure droite de régression dose-réponse, ou plus généralement log dose-réponse.

2. Analyse de variance du titrage final permettant d'estimer sa validité et les limites de confiance du résultat.

d) Enfin, pour terminer ce chapitre, il nous faut souligner l'importance d'une communauté de vue absolue, sans arrière pensée, entre industriels et contrôleurs, au sujet des normes réglementaires des procédés de titrages biologiques. Pour ce qui a trait aux Pharmacopées Nationales, notamment pour le Codex français, l'harmonisation des différents points de vue se fait au sein de la Commission du Codex qui groupe les principaux intéressés avec les représentants de l'Université et ceux de l'administration.

En règle générale, les méthodes de contrôles biologiques et les titrages de ce type ne sont adoptés qu'après des essais en commun (comme pour

tous les autres genres de contrôle de la Pharmacopée, du reste). Il en est de même pour la rédaction des monographies.

Tant que l'accord n'est pas au point, les articles du Codex restent réservés. L'avancement de nos connaissances scientifiques fait que, souvent, les monographies sont sans cesse revues et corrigées.

C'est ce qui explique, par exemple, la pauvreté relative de la Pharmacopée 1965, en ce qui concerne les vaccins viraux que nous avons soulignés plus haut. Les modifications accélérées de ce type de vaccins tant pour les techniques de fabrication que pour les techniques de contrôle, font que bien souvent les textes « relatifs au contrôle s'essouffent à vouloir serrer de près la réalité et la rigueur scientifique » selon l'expression d'un expert. Il ne faudrait pas en déduire que faute de monographie au Codex, ce contrôle est inexistant en France. Il existe et il est même très sévère, grâce à la procédure du visa, exposée au chapitre II de ce travail. Ne figurant pas à la Pharmacopée, nous n'en parlerons pas ici. Contentons-nous de dire que de tels contrôles sont de la compétence de la Section de Virologie du Laboratoire National de la Santé Publique (Division de Paris et de Lyon).

CONCLUSIONS

On peut voir, par ces quelques problèmes abordés dans ce travail, combien délicates sont les questions à résoudre pour rendre acceptables par tous et valables, ces contrôles biologiques pratiqués sur les produits dits d'origine biologique utilisés à des fins médicamenteuses et inscrits à la Pharmacopée.

Nous avons tenté d'exposer à nos confrères et collègues italiens comment nous concevions en France, par le truchement de la Pharmacopée Française, les solutions à apporter.

Les points les plus importants ont été soulignés et on peut voir que bon nombre de questions ouvrent des horizons sur des problèmes en pleine évolution, comme par exemple ceux des étalons, des souches diverses et de l'interprétation statistique des résultats.

Nul doute que de tels problèmes n'exigent des consultations qui dépassent le cadre national et nécessitent des solutions sur le plan international. C'est pourquoi un tel exposé, fait dans le cadre prestigieux de l'Institut Supérieur de la Santé à Rome, et devant un tel public, a été particulièrement intéressant et fructueux.

Nous sommes particulièrement reconnaissants à M. le Professeur G. B. Marini-Bettolo, Directeur, et à M. le Professeur G. Penso, Chef des Laboratoires de Microbiologie, de nous avoir invité à Rome et de faire publier cet exposé dans la Revue de l'Institut.