



ANALYSE

ACCÉLÉRER SANS CÉDER SUR LA QUALITÉ



Ingédients

Interview de David Seignolle, directeur général d'EuroAPI

Reportage

Mayoly investit 15 M€ pour deux nouvelles lignes

Conditionnement

Une machine pour les petits lots d'auto-injecteurs

L'analyse des endotoxines continue d'évoluer.



© bioMérieux - Florent Dubray

ENDOTOXINES

Les tests s'affranchissent du recours à l'animal

La mesure d'endotoxines réalisée historiquement à partir de sang de limule (arthropode marin) tend doucement vers sa substitution par des réactifs synthétiques. Leur utilisation a été récemment autorisée par la pharmacopée européenne et américaine.

Lorsqu'elles entrent dans l'organisme, les endotoxines - composants de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatif - ont un effet sur le système immunitaire pouvant provoquer de graves réactions inflammatoires, comme de la fièvre, un choc septique, voire la mort. Pour cette raison, il est important que ces bactéries, également appelées lipopolysaccharides (LPS), ne soient pas présentes dans les produits pharmaceutiques injectables et les dispositifs médicaux, ainsi que les matières premières telle l'eau pour les préparations d'injectables et les conteneurs primaires utilisés pour la production. Pour vérifier leur absence, l'industrie pharmaceutique utilise différents tests en laboratoire. Réalisés à l'origine sur l'animal, ils tendent désormais à être remplacés par des alternatives synthétiques pour des raisons éthiques et de disponibilité de la ressource. « À l'origine, le test de ces endotoxines était réalisé sur les lapins », rappelle Christian Poinsot, fondateur et conseiller scientifique du groupe Icare.

Des tests pyrogènes interdits depuis juillet 2025 par la Commission Européenne de la Pharmacopée en faveur du bien-être animal. « *Epuis dans les années 50, on s'est aperçu que le sang de limule, un arthropode marin souvent comparé à un crabe, gélifiait au contact de ces endotoxines* », complète Christian Poinsot. Cette méthode, moins impactante pour l'animal, consiste à ponctionner 10 à 30 % de son sang avant de le remettre à l'eau. La méthode provoque cependant une mortalité importante chez ces arthropodes, de l'ordre de 5 à 20 %, posant ainsi de nouveaux problèmes éthiques. En effet, deux des quatre espèces de limule ont été placées dans la liste rouge des espèces menacées de l'Union internationale pour la conservation de la nature (UICN) en raison de leur surexploitation pour l'alimentation, la recherche biomédicale et de la destruction de leur habitat.

Une nouvelle méthode calquée sur l'ancienne

Depuis les années 70, l'hémolymphe de limule est utilisée pour produire le réactif Lysat d'Amoebocyte de Limule (LAL) qui déclenche, en présence d'infime quantité d'endotoxines bactériennes, une série de réactions enzymatiques (proenzyme, protéine coagulogène). « *Les premiers tests avec le sang de limule consistaient à prendre un tube à essai, à y mettre le liquide à tester, puis le réactif et attendre une heure. Si le fond du tube était gélifié et avait changé de couleur, cela montrait la présence d'endotoxine* », décrit Chris-

tian Poinsot. Les tests actuels basés sur le sang de limule ont été légèrement modifiés « *en greffant des substrats colorés qui se révèlent en cas de gélification, afin de déduire par spectroscopie la concentration d'endotoxines en fonction de son changement de couleur à partir d'une gamme étalement.* » Depuis quelques années, les industriels proposent de nouvelles méthodes alternatives basées sur le même principe que le test classique : le facteur C recombinant (rFC) et la recombinante (rCR), qui utilisent des techniques de fluorescence et de chromogénie, dérivées des séquences génétiques de facteurs trouvés dans la limule. « *Le facteur C recombinant que l'on utilise est la première étape de la cascade recombinante, un ensemble de réactifs issus de la bio-production qui réplique aussi fidèlement que possible l'ensemble de la chaîne immunitaire employé par le sang de limule* » détaille Michael Reynier, vice-président senior de la franchise Pharma Quality Control chez Biomérieux. « *On copie la nature car cela fonctionne très bien !* » Et même mieux : ils nécessitent moins d'étapes, en utilisant des microplaques pré-enduites, que les méthodes traditionnelles.

Vers l'automatisation des analyses

En parallèle, les industriels développent des technologies d'automatisation de ces tests afin de répondre au manque de main d'œuvre, et permettre un gain de productivité dans la préparation d'échantillons et de réalisation des tests. « *Ils sont habituellement réalisés manuellement, ce qui implique de la variabilité dans la qualité ou l'homogénéité du pipetage* », explique Michael Reynier. « *L'automatisation permet de réduire de 10 % les erreurs et d'augmenter sensiblement le nombre de tests réalisés par un technicien* », chiffre-t-il. Biomérieux propose depuis plusieurs années une solution d'automatisation haute cadence, actuellement en phase de déploiement chez ses clients. L'automatisation permettrait ainsi, en fonction du volume de test des laboratoires, « *un gain de productivité allant jusqu'à 50 %* », affirme Michael Reynier. « *Ce n'est pas une mesure qui est uniforme, mais globalement pour les gros sites industriels avec de nombreux tests, les investisse-*

Avec l'automatisation, le pipetage pourrait se raréfier.



ments sont rentabilisés en moins d'un an. » Une rentabilité calculée sur le coût total d'utilisation, comprenant le réactif, le nombre de pipetage à réaliser, le temps de réalisation, le nombre de tests invalides et le gain de temps induit par l'automatisation. De plus, « *avec l'évolution extrêmement rapide des modalités thérapeutiques, comme les ARN messagers ou les thérapies cellulaires géniques, il y a beaucoup de complexité additionnelle dans le contrôle qualité* », ajoute Michael Reynier. « *Dans le cas des thérapies cellulaires géniques, quelques jours comptent et on travaille avec nos clients pour réduire cette complexité et leur faire gagner ces jours.* »

Une lente adoption des nouvelles méthodes

Pour le moment, les efforts sont focalisés sur le facteur rFC. « *Nous avons déjà beaucoup de travail de conversion à réaliser pour faciliter l'adoption de la technologie recombinante* », confie Michael Reynier. « *Mais une fois la méthode adoptée, il y aura encore des innovations à apporter sur la nature des capteurs utilisés, la manière dont on les positionne, dont on automatisera...* ». Sachant que l'implémentation d'une nouvelle technologie peut prendre jusqu'à 10 ans, « *il n'y a pas beaucoup de valeur à nous positionner tous les trois ans sur quelque chose de nouveau. Nous investirons dans la prochaine technologie qui nous paraîtra véritablement stable et qui apportera suffisamment d'amélioration, de simplification, de rapidité et de réduction de coût, lorsque le niveau de maturité sera suffisant* », ajoute-t-il. Aujourd'hui, les deux méthodes cohabitent car le sang de limule n'est pas interdit. Il représente même la grande majorité des tests actuels. « *Nous sommes dans une période intermédiaire, mais on tend vers l'arrêt d'utilisation du sang de limule* », affirme Christian Poinsot. « *Mais il faut rappeler que les tests sur les lapins viennent tout juste d'être interdits alors que le sang de limule est entré dans la pharmacopée dans les années 90. Il va se passer encore un certain nombre d'années avant que le sang de limule soit interdit* », projette-t-il.

SÉVERINE FONTAINE

Une autorisation récente

La Commission européenne de Pharmacopée (EPC) a validé officiellement en juillet 2020 l'utilisation de la méthode du facteur C recombinant (rFC) pour la quantification des endotoxines produites par des bactéries gram-négatives avec détection par fluorimétrie. Elle est suivie quelques années plus tard, en mars 2025, par la pharmacopée

des Etats-Unis. Cependant, « *la situation n'est pas encore stabilisée dans des pays comme la Corée, le Japon et la Chine, où des textes sont en discussion, mais leur publication pourra encore prendre des années* », ajoute Michael Reynier, vice-président senior de la franchise contrôle pharmacologique chez Biomérieux. De plus, « *la norme ISO 11737-3, dont le comité de*

pilotage se situe aux Etats-Unis, indique que le facteur rFC ne s'applique pas aux dispositifs médicaux, probablement en raison du lobbying de parties prenantes ayant intérêt à retarder l'utilisation du facteur rFC », commente Christian Poinsot. « *Cependant, de nouveaux projets arrivent pour autoriser son utilisation, mais la normalisation prend beaucoup de temps.* »