

Stage d'insertion en milieu professionnel

Période du stage :

Du 01/04/2018 Au 12/04/2018.

Lieu du stage :

Institut Pasteur d'Algérie,
laboratoire de contrôle qualité
des vaccins et des sérums.

Stagiaire :

LEFOUILI Messaoud.

AISSAOUI Mohamed Amine.

Année d'étude : 4ème année.

Enseignant
réfèrent :

Dr.rira moufida.

Maître du stage en
entreprise :

KEZZAL Salim.

Année universitaire : 2017/2018

SOMMAIRE

I- Introduction générale.....	4
I-1 Description du stage.....	4
I-2 Objectifs du stage.....	4
II- Présentation de l'entreprise.....	4
II-1 Situation géographique.....	4
II-2 Historique de l'entreprise.....	4
II-3 Secteur d'activité.....	5
II-4 Place de l'entreprise dans son secteur d'activité.....	5
III- Description des tâches effectuées dans le stage.....	6
III-1 Unité microbiologie.....	6
III-1-1 Test de Stérilité.....	6
III-1-2 Identification.....	6
III-1-3 Test de fertilité.....	7
III-2 Unité immunochimie.....	8
III-2-1 -Test d'immunodiffusion.....	8
III-2-1 Test ELISA (hépatite B).....	9
III-3 Unité Pharmacotoxicologie.....	10
III-4 Unité Culture cellulaire.....	11
III-4-1 Culture cellulaire.....	11
III-5 Unité de physicochimie.....	13
III-5-1 dosage des protéines.....	13
IV- Conclusion.....	13
Références.....	13

Remerciements

Mr. KEZZAL Salim

Nous vous remercions de bien avoir voulu nous accueillir pour effectuer le stage au niveau du laboratoire de contrôle qualité, vaccins et sérums.

Ces 15 jours passés au sein du laboratoire de contrôle qualité des vaccins et des sérums au niveau de l'institut pasteur d'Algérie à Dely Brahim nous ont permis d'approfondir nos connaissances d'une part et d'autre part facilité notre insertion dans le domaine professionnel.

On tient également à exprimer toute notre gratitude et notre reconnaissance et remercier toute l'équipe, pour son aide et son accueil. Bénéficier de vos compétences et de votre disponibilité fut un réel privilège.

Nous souhaitons en dernier lieu exprimer notre gratitude envers les responsables de l'école nationale supérieure de biotechnologie notamment le chef de département Mr Adel Mohamed Kechekar de nous avoir donné la chance d'avoir un stage de perfectionnement.

Nous vous prions d'agréer, Madame, Monsieur, l'expression de nos salutations distinguées.

I- Introduction générale

Dans le cadre du stage d'insertion en milieu professionnel et durant la période du 01/04/2018 au 12/04/2018, nous avons effectué un stage au sein du laboratoire de contrôle qualité des vaccins et des sérums au niveau de l'institut Pasteur d'Algérie à Dely Brahim. Ce stage a eu pour but de nous permettre d'élargir et de renforcer nos connaissances concernant les réalités techniques et économiques du milieu professionnel et aussi nous permettre de mettre en pratique nos connaissances acquises lors de notre formation au niveau de l'école nationale supérieure de biotechnologie. Le choix de ce laboratoire a été motivé par notre désir d'approfondir nos connaissances en biotechnologie et aussi de s'initier aux bonnes pratiques de laboratoire lors des manipulations et qui nous servira dans notre spécialité « biotechnologie microbienne ».

I-1 Description du stage

On a fait notre stage au niveau du laboratoire de contrôle qualité des vaccins et des sérums, où on a exploité les divers tests mis en place pour tester la conformité d'un produit biologique.

I-2 Les objectifs du stage

Ce stage a pour objectif de nous permettre d'approfondir nos connaissances liées à la biotechnologie en exploitant les différents tests mis en place pour tester la conformité d'un produit biologique.

II- Présentation de l'entreprise

II-1 Situation géographique

L'Institut Pasteur d'Algérie dispose actuellement de 5 sites sur Alger et de 3 sites régionaux. Le Siège social de l'Institut Pasteur d'Algérie de Dely Brahim est situé Route du petit Staouéli, Dely Brahim, Alger, Algérie. Sur une assiette de 30 hectares. Ses coordonnées géographiques sont: latitude 36.75, longitude 2.96.

II-2 Historique de l'entreprise

L'Institut Pasteur d'Alger a été créé en 1894, à l'initiative des Docteurs **Jean Baptiste Paulin TROLARD** et **H. SOULIE**. Ils avaient pour mission au départ, d'assurer le traitement antirabique des personnes mordues. Il devient en décembre 1909 l'institut Pasteur d'Algérie.

Il restera une filiale de la fondation « Institut Pasteur de Paris » jusqu'en 1962 et devient en 1971 un Institut algérien créé par l'ordonnance n°71-45 du 21 juin 1971, comme établissement d'utilité publique sans but lucratif, doté de la personnalité civile.

En 1972, son organisation et missions en tant qu'établissement de référence, de recherche, de formation et d'appui aux programmes nationaux de santé publique sont définies par le décret n°72-165 du 27 juillet 1972 portant organisation de l'Institut Pasteur.

Le Nouvel Institut Pasteur d'Algérie (NIPA), nouveau siège social de l'Institut Pasteur d'Algérie à Dely Brahim a été initié en 1974 dans le but de regrouper tous les sites de l'IPA d'une part, et augmenter la gamme de production des vaccins et sérums à usage humain et à usage vétérinaire selon les normes G.M.P., d'autre part, outre l'optimisation de la production (vaccins antirabiques, sérums thérapeutiques, milieux de culture), il a été programmé l'acquisition de process pour une partie des vaccins du programme élargi de vaccination (PEV), et pour les vaccins utilisés dans le cadre de prophylaxie de masse pour le cheptel.

Le projet a été à l'arrêt depuis 1986, a été repris en 2005 et après transfert de certains services, il abrite actuellement : La direction générale et toutes les structures administratives, les principaux services de diagnostic spécifique et de recherche en bactériologie, immunologie, parasitologie, mycologie, le service de contrôle de qualité bactériologique des aliments et des eaux, le service de contrôle qualité des vaccins et sérums, le centre de prélèvement et enfin, les chevaux producteurs de sérums antivenimeux.

En 1994, eu égard à ses activités de production et de commercialisation de sérums, de vaccins et de produits biologiques, l'Institut Pasteur d'Algérie est érigé en établissement Public à caractères industriel et commercial (EPIC) par le décret n°94-74 du 30 mars 1994.

L'Institut Pasteur d'Algérie fait également partie du réseau international des instituts Pasteur (RIIP), qui comprend 32 instituts Pasteur, dont l'objectif est de développer un programme de coopération scientifique en matière de prévention et de protection de la santé et la surveillance des maladies infectieuses et parasitaires (SIDA, Grippe, Tuberculose, Paludisme, Choléra)

II-3 Secteur d'activité

Placé sous la tutelle du ministère de la santé de la population et la réforme hospitalière **L'Institut Pasteur d'Algérie (IPA)** est un Etablissement public à caractère industriel et commercial.

II-4 Place de l'entreprise dans son secteur d'activité

L'objectif commun de l'Institut Pasteur d'Algérie est d'élaborer un programme de coopération scientifique notamment pour : La protection de la santé publique, en particulier pour la surveillance et le contrôle épidémiologique des maladies infectieuses et parasitaires (Sida, grippe, tuberculose, paludisme, choléra, etc.); La Distribution des vaccins dans le cadre de la prévention sanitaire en notant que L'IPA a le monopole de la production et de la commercialisation des vaccins à usage humain ;La participation aux grands programmes internationaux ou régionaux de recherche (recherches cliniques, enquêtes épidémiologiques, recherches fondamentales, etc.); La formation du personnel scientifique (biologistes, chercheurs et techniciens) dans le cadre de leur activité de santé publique et de recherche.

III- Description des tâches effectuées dans le stage :

Le laboratoire de contrôle qualité des vaccins et des sérums test la conformité des produits biologiques aux spécifications du dossier d'enregistrement du produit, les méthodes de contrôle appliquées par ce laboratoire sont issues de référentiels en particulier la pharmacopée Européenne. Le contrôle concerne principalement : la stérilité, les tests physico-chimiques, l'activité et la toxicité. Le lot du produit biologique doit être conforme aux spécifications de la totalité de ces paramètres pour être libéré et permettre sa circulation sur le marché.

III-1 Unité microbiologie

III-1-1 Test de Stérilité

Le contrôle microbiologique est réalisé pour vérifier l'absence de contaminations bactériennes et fongiques. Au niveau de cette unité plusieurs produits sont examinés ; les vaccins, les sérums, les solvants, les produits thérapeutiques et les dispositifs médicaux.

Le test de stérilité est effectué en mettant le produit à tester dans des milieux favorables à la croissance bactérienne et fongique, donc on utilise deux milieux : le bouillon de thioglycolate avec résazurine pour tester s'il y a une croissance bactérienne et le TSB (bouillon tryptone soya) pour tester s'il y a une croissance de champignons.

Les deux milieux sont répartis dans des flacons bien fermés. Les produits biologiques sont ensuite introduits dans des conditions stériles pour éviter les résultats faussement positifs. Les produits ne sont pas prélevés d'une seule ampoule, on prend toujours un mélange de 5 ampoules issues d'un échantillonnage.

Les flacons sont ensuite incubés à 30°C pour thioglycolate et à 25°C pour le TSB pendant 14 j en faisant des observations chaque jour pour vérifier s'il y a un trouble qui indique une croissance. On utilise toujours des flacons de solution de NaCl, comme témoins.

Si un trouble apparaît on arrête le test pour passer à l'identification des germes présents en utilisant différents milieux de culture sélectifs, et après des galeries biochimiques correspondantes à l'espèce suspectée exemple : galerie api 20^E pour les entérobactéries, galerie api staph pour les staph ...ect.

Si 14 jours passent sans observation de trouble le test est conforme : absence de contamination bactérienne et fongique.

III-1-2-identification

Lorsqu'une contamination de produit biologique est détectée lors du test de stérilité, les souches contaminantes doivent être identifiées, cela se fait en plusieurs étapes en commençant par des ensemencements sur des milieux sélectifs telle que : gélose au sang, GN (gélose nutritive), Sabouraud, Hektoen, Chapman, BCP (Bismocresol Purple). Le but de cette ensemencement est d'isoler des souches et de s'orienter vers un type plus précis des microorganismes. Les souches isolées sont identifiées à l'aide de divers tests biochimiques (test d'oxydase, test de catalase, TSI : pour tester le pouvoir de dégradation des sucres, Mannitol pour tester la mobilité, King I et King II...ect). Lorsque les résultats permettent de classer le germe dans une famille précise comme les entérobactéries ou les

staphylococcus, une galerie API correspondant à cette famille est utilisée pour identifier l'espèce. Dans la figure 1 un exemple d'une galerie Staph. La lecture se fait par une fiche spécifiée (Figure 2).



Figure 1. Résultat d'une galerie API

API Staph

REF: LM

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origen / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX

1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR			
6			3			7			6			1			5			2					

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

6376152

Ident. / Ταυτοποίηση :
Staph. xylosum

Imprimé en France / Printed in France

Figure 2. La lecture de galerie staph.

III-1-3- test de fertilité

C'est la capacité d'un milieu de culture à récupérer quantitativement certains micro-organismes cibles.

Les milieux utilisés pour le test de la stérilité sont préparés localement.

Ces milieux doivent être fertiles pour cela un test de fertilité est réalisé.

La fertilité du milieu TG est testée par trois souches:

- *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Staphylococcus aureus*.
- *Clostridium sporogenes*.

Il faut utiliser une souche de 24h (fraîche), déjà identifiée.

Procédure

Le test nécessite une suspension bactérienne de 100UFC pour cela :

Une suspension de 10ml de 0,5 Mcfarland de la souche est préparée (solution mère de 10^8 colonies), puis des dilutions en cascade de 10^{-1} sont effectués jusqu'à la dilution 10^{-6} qui contient 100UFC.

5 mL de la suspension bactérienne préparée est injectée dans chaque flacon qui contient 45 mL de milieu TG.
Les flacons sont incubés à 36°C pendant 3 jours.

Lecture:

Pour dire que le milieu est fertile, un trouble doit être observé (qui indique une croissance bactérienne). une identification est aussi faite pour vérifier que la croissance correspond à la bactérie injectée.

Pour que le milieu soit utilisable il doit répondre à deux autres paramètres : la stérilité et le pH (neutre).

III-2 Unité d'immunochimie (contrôle d'identité et d'activité)

III-2-1 -Test d'immunodiffusion

- Immunodiffusion simple
- Immunodiffusion radiale : la grippe par exemple :

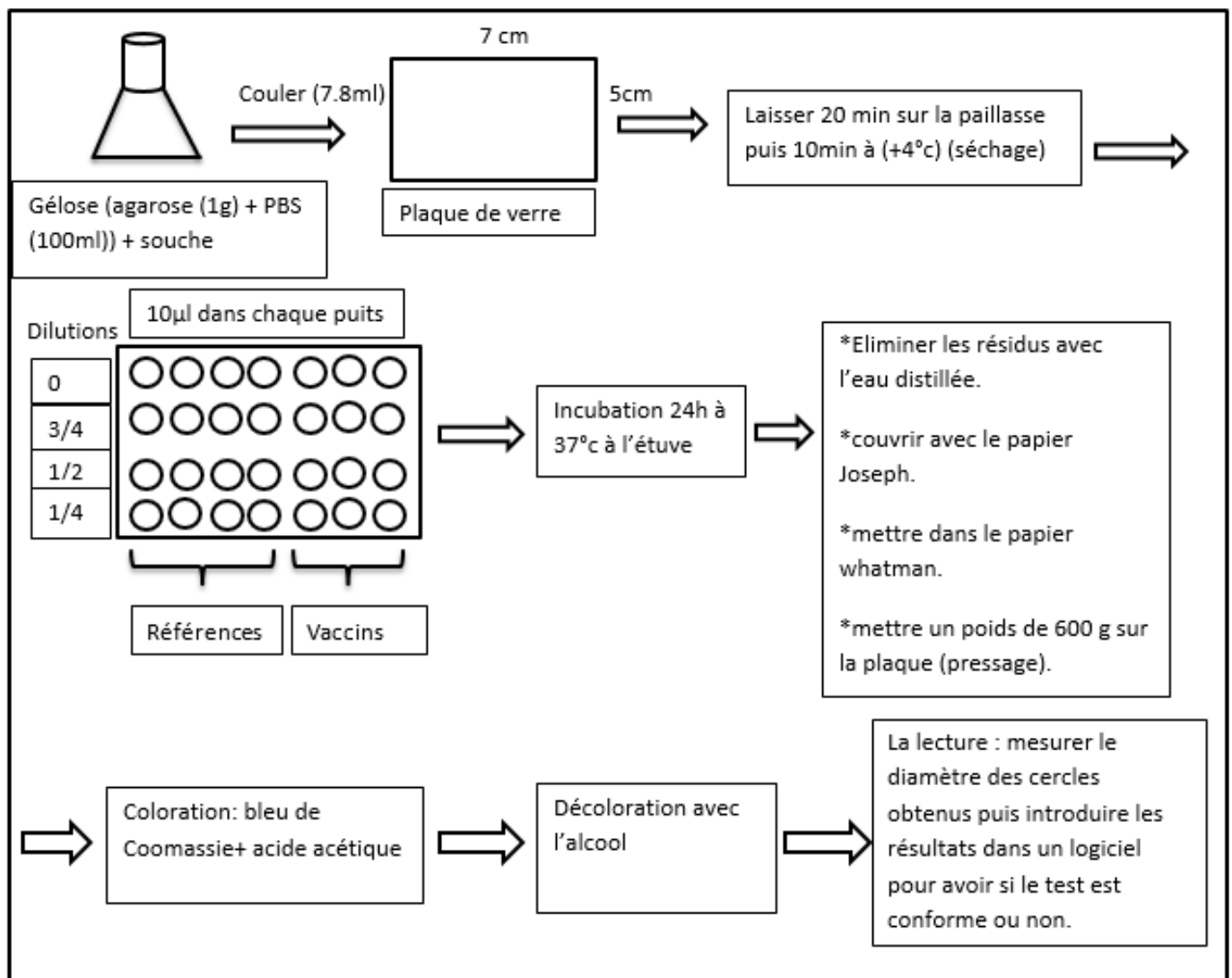


Figure 3. Les étapes d'un test de la grippe par Immunodiffusion radiale.

III-2-2 Test ELISA (Hépatite B) (contrôle d'activité et d'identité)

Technique d'Elisa Sandwich : pour Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, utilise un premier anticorps spécifique de la protéine recherchée qui est immobilisé sur un support plastique et qui va capter la protéine recherchée. Dans un deuxième temps, un deuxième anticorps spécifique, couplé à une enzyme (un conjugué), est fixé sur la protéine d'intérêt. Le système est ensuite révélé par l'addition d'un substrat qui se colore. Ce test est qualitatif.

Procédure

On doit avoir un standard du vaccin à concentration connue.

On fait un pool de 5 ampoules de vaccins (un échantillonnage).

Des dilutions en cascade par solution de PBS (BSA à 0.2%) sont appliquées sur le standard et le vaccin jusqu'à la dilution 1/64000.

On prend toujours les quatre dernières dilutions : 1/8000, 1/16000, 1/32000 et 1/64000.

Le kit utilisé au niveau de ce labo pour le test Elisa est : **Monolisa HBS ag ultra (marque : BIORAD)**.

Les étapes du test ELISA

Le test se fait sur une microplaque Elisa.

On fait n distributions de contrôle, de standard et de notre échantillon (les vaccins). Pour le standard et le vaccin on fait 3 essais pour les 4 dilutions.

Ajout de solution conjugué dilué (anti-anticorps HBs + Tampon Tris HCl pH 7,4).

Incubation à 37°C pendant 1h et 30 min, éliminer le conjugué et faire 5 lavages par solution tampon Tris NaCl pH 7,4 pour éliminer les résidus (Il ne reste que le complexe anticorps-antigène).

Ajout de la solution de substrat.

Incuber pendant 30 minutes à l'obscurité à température ambiante.

Ajouter la solution de blocage d'activité enzymatique (acide Sulfurique).

Lire la densité optique à 450/620-700nm de la plaque en utilisant le lecteur ELISA.

Les résultats sont présentés en densité optique. Pour l'interprétation ils sont convertis en log (Tableau 1).

Tableau01. Les résultats de test ELISA de vaccin Hépatite B.

	1	2	3	4
A	-	1.60	1.39	1.61
B	-	1.73	2.11	1.53
C	-	1.82	2.12	1.27
D	-	1.43	2.03	1.36
E	+	1.43	1.86	1.40
F	1.88	1.62	1.88	
G	1.91	1.22	1.75	
H	2.10	1.56	1.66	

Ces résultats sont ensuite introduits dans un logiciel pour dire si le test ELISA du lot du vaccin est conforme ou non.

III-3 Unité de Pharmacotoxicologie (test de toxicité)

La toxicité anormale est un test de sécurité des produits biologiques injectables (vaccin et immuno-sérum) ce test est appliqué à des animaux de laboratoire auxquels on injecte le produit fini. Après une période d'observation on évalue la tolérance du produit injecté.

La toxicité anormale de toute préparation faisant l'objet de cette procédure est une toxicité due à des substances autres que le principe actif qui est utilisé pour la production.

L'injection intrapéritonéale permet un maximum d'absorption de la préparation à travers l'intestin grêle, et par voie de conséquence permet de transférer à l'animal une quantité maximale de toute substance toxique présente dans la préparation.

Mode opératoire:

Les souris utilisées sont de sexe masculin et leur poids se situe entre 17 et 24g.

Avant le test, Les souris sont pesées.

On choisit 5 souris saines de poids entre 17 et 24 g.

Tous les souris doivent être reconnues les uns des autres d'où la nécessité d'un marquage individuelle. Les souris sont marquées comme suit: Tête rouge(TR), queue rouge(QR), tête bleue(TB), queue bleue(QB), tête rouge et queue bleue(TRQT).

Les souris utilisées dans cette étude sont soumises à des pesées le J₀ et le J₇ (tableau 02), ainsi que des observations journalières pour voir s'il y a des symptômes anormaux.

Une fiche de test est remplie comme suit :

- 0 : pour un animal en bonne santé.
- M: pour un animal malade.
- +: pour animal mort.

Résultats et discussions

- Si les 5 souris sont saines: le produit est conforme.
- Si une souris est morte ou plus d'un souris présente des symptômes de maladie: le test est non conforme (le lot est rejeté).
- Si une seule souris est malade : on passe au 2^{ème} test (répétition).

Tableau02. Pesées des souris injectées par le sérum anti-scorpionique

Identification individuelle	Pesée initiale	Date initiale	Pesée finale	Date finale	différence de poids
Souris					
TR	18.45	03/04/2018	25.05	10/04/2018	+6.60
QR	22.97		26.30		+3.33
TB	17.00		25.98		+8.98
QB	22.59		26.73		+4.14
TRQB	18.29		23.19		+4.90

On remarque qu'il y a aucune perte de poids. Avec une absence de symptômes de maladie ou de mort.

Interprétation

Le test est satisfaisant selon la spécification (aucun des animaux ne doit mourir ou présenter de symptômes de maladie).

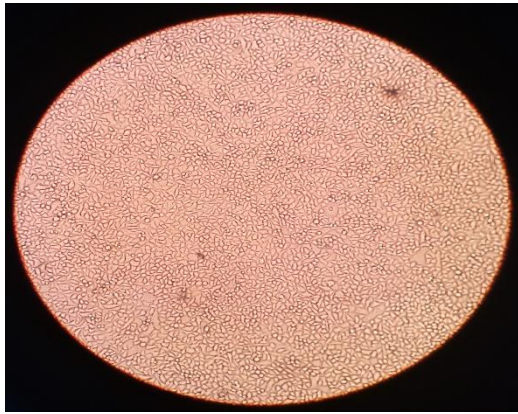
III-4 Unité culture cellulaire

III-4-1 Culture cellulaire

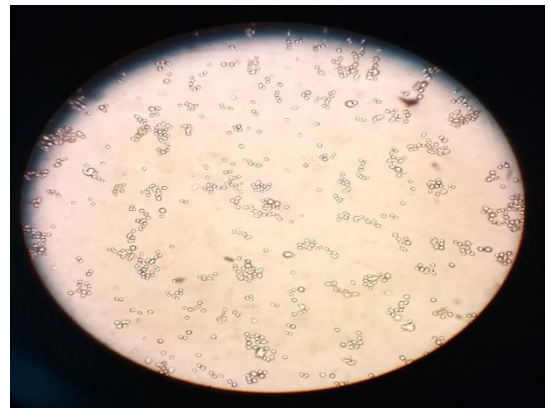
Le Test d'activité de vaccin sur les cellules se fait par le titrage de nombre des ecp (effet cyto-pathogène virale).

Préparation des cellules HEP2

Les cellules cultivées dans la boîte sont adhérentes entre elles et attachées sur la paroi sous forme d'un tapis cellulaire (Figure 04, a), on doit les détacher par une trypsination(Figure04,b).



a



b

Figure 4. Observation microscopique de cellules HEP2

Les étapes de la trypsination

Eliminer le milieu de culture.

Faire un rinçage par PBS (pour éliminer le milieu et le SVF).

Ajout de 1ml de trypsine TDA (à une température de 37°C).

Mettre la boîte dans l'étuve à CO₂ (36,5°C et 5%CO₂).

Ajouter 9ml de milieu de culture EMEM on mélange bien pour éviter d'avoir des amas.

On doit après faire un comptage pour vérifier qu'on a la quantité nécessaire de cellules pour le test (80000cellule/ml).le comptage se fait dans des cellules de Neubauer en utilisant le colorant bleu de trypan.

Test de vaccin

Le Vaccin est un polyvalent de type 1 et type 3 pour cela pour chaque type on doit neutraliser l'autre type par des antisérums

Avant le test on fait toujours une série de dilution jusqu'à 10^{-7.5}, donc chaque test d'un sérotype nécessite une dilution favorable.

On dépose les dilutions dans 8 cupules de la microplaque où on met 50µl de diluant et 50µl d'antisérum.

Après on les incube pendant 3h puis on ajoute 100µl des cellules HEP2 (des cellules cancérogènes).

Lecture

Observer les ECP sous microscope à partir du 5^{ème} jour.

La lecture finale est réalisée entre le 7^{ème} et le 10^{ème} jour.

Calcul

Le calcul du titre du vaccin se fait selon la méthode de Spearman-Kaber pour chaque serotype du vaccin et polio totale:

$$\text{Log DICC50} = \log(1^{\text{ère}} \text{ dilution}) - \log(\text{facteur de dilution}) * \left[\frac{\text{nombre total d'ECP des cupules}}{\text{nombre total de cupules inoculées par dilution}} - 0.5 \right]$$

Puis on compare le $10^{\log \text{DICC50}}$ aux normes pour dire est ce que ce test est conforme ou non.

III-5 Unité physicochimie

III-5-1 dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales dans les vaccins et sérums suit la méthode de biuret.

Principe de la méthode : elle repose sur la propriété que possèdent les protéines d'interagir avec l'ion cuivrique (Cu^{+2}), en milieu alcalin, en donnant un produit de réaction qui présente une absorbance à 545nm.

Le réactif au biuret contient du sulfate de cuivre, eau distillée le citrate de sodium, carbonate de sodium anhydre R.

On prépare toujours deux échantillons, on prend 1ml de produit à tester, on ajoute 1ml de NaOH 6% et 400µl réactif de biuret.

On incube pendant 90mins puis on détermine la concentration par spectrophotomètre à longueur d'onde 545nm.

IV- Conclusion

Le stage que nous avons effectué au sein d'Institut Pasteur d'Algérie au niveau du laboratoire de contrôle qualité des vaccins et sérums a bien répondu à l'objectif prévu, à savoir un stage de perfectionnement. Il nous a donné l'occasion de nous familiariser avec les différentes unités du laboratoire de contrôle et d'avoir une approche réelle du monde du travail. Il a permis de vérifier la qualité d'un produit biologique, et l'exactitude de ses paramètres en exploitant plusieurs méthodes d'analyse des produits biologiques, pour tester la conformité d'un lot.

Ce stage a apporté un plus, à nos formations initiales il a été d'une grande utilité dans notre domaine de formation en tant que futur biotechnologues car les tâches effectuées dans le laboratoire de contrôle de qualité était très enrichissantes et en rapport direct avec les connaissances acquises à l'école nationale supérieure de biotechnologie.

Référence :

www.pasteur.dz

<http://www.phylogene.com/index.php?pagendx=50>