

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB BLIDA - 1



FACULTÉ DE MÉDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE

Mémoire de fin d'études

PRESENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE DOCTEUR EN PHARMACIE

BIOTECHNOLOGIE DES MÉDICAMENTS

FABRICATION ET ÉTAPES DE CONTRÔLE DU VACCIN HÉPATITE B

- INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE -

Session : Juin 2015

Présenté par :

- JEKE Lloyd Tandavarai
- KAWOOYA Francis
- USTÁ Nádia Vanessa Lucas

Devant le jury :

Présidente : Pr. DJERMOUNE Salima, Maître de conférence en pharmacie galénique

Promotrice : Dr. ARAR Karima Maître assistante en pharmacognosie

Examineur : Dr. DJELLOULI Salim, Maître assistant en pharmacologie

SERMENT D'HIPPOCRATE

AU MOMENT D'ÊTRE ADMIS COMME MEMBRE DE LA PROFESSION MÉDICALE:

JE PRENDS L'ENGAGEMENT SOLENNEL de consacrer ma vie au service de l'humanité;

JE TÉMOIGNERAI à mes maîtres le respect et la reconnaissance qui leur sont dus;

J'EXERCERAI ma profession avec conscience et dignité;

JE CONSIDÉRERAI la santé de mon patient comme mon premier souci;

JE RESPECTERAI les secrets qui me seront confiés, même après la mort du patient;

JE MAINTIENDRAI, dans toute la mesure de mes moyens, l'honneur et les nobles traditions de la profession médicale;

MES COLLÈGUES seront mes sœurs et mes frères;

JE NE PERMETTRAI PAS que des considérations d'âge, de maladie ou d'infirmité, de croyance, d'origine ethnique, de sexe, de nationalité, d'affiliation politique, de race, d'inclinaison sexuelle, de statut social ou tout autre critère s'interposent entre mon devoir et mon patient;

JE GARDERAI le respect absolu de la vie humaine;

JE N'UTILISERAI PAS mes connaissances médicales pour enfreindre les droits de l'homme et les libertés civiques, même sous la menace;

JE FAIS CES PROMESSES solennellement, librement et sur l'honneur.

Déclaration Genève, 1948.

DEDICACE

Je dédie ce Mémoire...

À MES TRÈS CHERS PARENTS

À qui je dois tout, et pour qui aucune dédicace ne saurait exprimer mon profond amour, ma gratitude, ni mon infinie reconnaissance pour l'ampleur des sacrifices et des souffrances que vous avez enduré pour mon éducation; pour mon bien être, vous n'avez jamais cessé de lutter. Vos prières et votre présence à mes coté ont été pour moi d'un grand soutien moral tout au long de ma vie. Puisse Dieu tout puissant vous protéger, vous procurer longue vie, santé et bonheur afin que je puisse vous rendre un minimum de ce que je vous dois.

À MES CHÈRES SOEURS : LOUISE, LOURINE

Je vous dédie ce travail, puissions-nous rester unis. J'implore Dieu qu'il vous apporte bonheur et prospérité.

À MES COLLEGUÉS : Francis, Nadia...

À TOUS MES AMIS (ES) : Makonese Cleophas, Shambira Terrence, Bangira Tapiwa, Tsvere Tapiwa, Mutume Irvin, Maviya Justice, Pendeke Tafadzwa, Nyengera Tanaka...

À TOUS CEUX QUI ME SONT CHÈRES ET QUE J'AI OMIS DE CITER...

Qu'ils me pardonnent...

Jeke Lloyd Tandavarai

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail:

À mes chers parents en témoignage de l'amour, du respect et de ma profonde et éternelle gratitude que je leurs porte et ma reconnaissance pour leur soutien et leur encouragement qu'ils m'ont prodigués tout au long de ma vie.

À tous mes chers frères et sœurs pour leur encouragement, spécialement Miss MASSY MUGOOWA et Pr. NTALE M pour leur sacrifices et leur aide illimité tout au long de mes études, Que dieu vous préserve longue de vie et prospérité.

À ma future femme SOPHIA NYENDE pour son supporte et encouragement tout au long de mes études

À notre VICTORIA ANNABELLE.

À notre promotrice Dr. ARARK.

À mes collègues Lloyd et Nádia.

À tous mes amis, spécialement HAJUSU, MASIGA, SEBABENGA, SEMANDA, et MUKIIBI.

À tous les enseignants du département de pharmacie à l'université de BLIDA-1 pour bon travail tout le long des mes études.

À tous ceux qui pense à moi et que je n'ai pas mentionné.

Kawooya Francis

DEDICACE

*Je dédie cette thèse en témoignage de mon profond amour et gratitude à
mes chers parents :*

*Aucune dédicace ne serait assez pour exprimer ce que vous méritez pour
tous les sacrifices infinis, pour m'avoir donné le bon et le meilleur pour
mon éducation et mon bien être, pour les encouragements et vos prières
à chaque jour.*

À mes frères : Bruno, Nuno et Camilo

À mon Malik Ustá

*Qui le bon Dieu toute puissant vos garde, vos protège et vos bénisse à
chaque jour.*

*À la mémoire de mon cher oncle Abu Hureira Ustá, plus qu'un oncle
vous étiez un parrain, un père, qui Dieu le tout puissant l'accorde son
paradis éternel*

À mes collègues : Lloyd et Francis

*Et à tous qui me sont chers, à tous qui j'aime et qui m'aiment
Je dédie ce travail*

Nádia Vanessa Lucas Ustá

REMECIEMENTS

Nous tenons à remercier tout d'abord à DIEU, le tout puissant, qui nous a donné la force et le courage d'accomplir ce travail.

Nous tenons à remercier sincèrement à Docteur ARAR K, notre promotrice de mémoire, pour votre encadrement, vos conseils précieux, votre aide et ainsi que pour la confiance que vous nous avez apporté dans la réalisation de cette mémoire.

On adresse nos remerciements au Directeur Général, Chef de ressources humaines de L'INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE, qui nous on fournit un terrain de stage.

On tient à remercier vivement le responsable des laboratoires de contrôle et animalerie Docteur KEZZAL Salim et toute son équipe pour leur accueil, leur soutien, leur encadrement leurs expertises au quotidien, ainsi que leur dévouement et leur esprit d'équipe.

Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury pour l'intérêt qu'ils ont porté en acceptant d'évaluer notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nos remerciements vont également au corps professoral du Département de Pharmacie de l'Université de Blida, pour la qualité et la richesse de leur enseignement, ce qui nous a assuré une formation de qualité et actualisée.

Sans oublier nos parents et amis qui nous sont soutenus et qui nous ont aidées à surmonter à chaque obstacle.

Table des matières

Liste des tableaux.....	iv
Liste des figures.....	v
Liste des abréviations.....	vi

Introduction générale.....	1
-----------------------------------	----------

PARTIE THÉORIQUE

1. Biotechnologie.....	3
1.1 Historique.....	3
1.2 Définition de la biotechnologie.....	3
1.3 Comment la biologie guide la biotechnologie ?.....	5
1.4 Principe de la biotechnologie.....	5
1.5 Différents domaines d'applications.....	5
2. Médicament.....	7
2.1 Définitions.....	7
2.2 Classification des médicaments.....	8
2.3 Médicaments génériques.....	10
2.4 Médicaments biosimilaires.....	10
2.5 Différences entre un médicament générique et un médicament biosimilaire.....	11
2.6 Particularités des traitements biotechnologiques.....	12
2.7 Risques liés aux biomédicaments.....	14
2.8 Avenir des médicaments biotechnologiques.....	15
3. Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires.....	17
3.1 Classification des produits biologiques	17
3.1.1 Classification Anatomical Therapeutic Chemical (ATC).....	19
3.1.2 Classification pharmacologiques des biomédicaments.....	21
3.1.3 Classification par aires thérapeutiques des biomédicaments.....	22
3.2 Enjeux du biomédicament.....	23
3.3 Intérêt du recours aux biomédicaments.....	25
3.4 Aspects réglementaires.....	26
3.4.1 Développement d'un biomédicament.....	26
3.4.2 Textes réglementaires spécifiques des produits issus des biotechnologies.....	28
3.4.3 Conditions nécessaires à la production d'un biomédicament.....	30
3.5 Fabrication des biomédicaments.....	31
3.5.1 Technique de formulation.....	32
3.5.2 Étapes nécessaires à la synthèse d'une protéine recombinante.....	32
3.5.2.1 Identification du gène et choix de la cellule hôte.....	33
3.5.2.2 Manipulation du plasmide cellulaire.....	34
3.5.2.3 Culture et multiplication des cellules.....	35
3.5.2.4 Synthèse de la protéine recombinante.....	36
3.5.2.5 Purification de la protéine synthétisée.....	37
3.5.2.6 Formulation du médicament.....	38
3.5.2.7 Conditionnement pharmaceutique.....	38

Table des matières

3.5.2.8	Contrôle qualité des protéines recombinantes (biomédicaments).....	39
4.	Exemples de biomédicaments.....	44
4.1.	Vaccin de l'hépatite B rADN.....	45
4.2.	Production du vaccin de l'hépatite B rADN.....	45
4.3.	Nécessité du contrôle du vaccin hépatite B rADN.....	47

PARTIE PRATIQUE

1.	Objectif du travail.....	48
2.	Matériels et méthodes.....	49
2.1.	Matériels.....	49
2.1.1.	Matériels biologiques.....	49
2.1.2.	Réactifs chimiques.....	49
2.1.3.	Appareillage.....	50
2.1.4.	Verrerie.....	51
2.1.5.	Consommable	51
2.2.	Méthodes.....	52
2.2.1.	Essais physico-chimiques.....	52
2.2.2.	Essais microbiologiques.....	57
2.2.3.	Essais pharmaco-toxicologiques.....	59
2.2.4.	Essais immunochimiques.....	62
3.	Résultats et discussion	66
3.1.	Résultats de l'analyse physico-chimique.....	66
3.2.	Résultats de l'analyse microbiologique.....	68
3.3.	Résultats de l'analyse pharmaco-toxicologique.....	68
3.4.	Résultats de l'analyse immunochimique.....	68
	Conclusion.....	70
	Références bibliographique.....	71
	Annexes.....	i
	Résumé.....	vii

Liste des tableaux

Tableau 1 : Données requises pour l'évaluation d'un produit générique et d'un produit biosimilaire.....	11
Tableau 2 : Caractéristiques des traitements conventionnels et biotechnologiques.....	13
Tableau 3 : Caractéristiques physico chimiques du produit fini.....	41
Tableau 4 : Résultats de la limpidité.....	66
Tableau 5 : Résultats du volume extractible(V_{ext}).....	66
Tableau 6 : Résultats du pH.....	66
Tableau 7 : Résultats du dosage d'aluminium.....	67
Tableau 8 : Résultats du dosage de thiomersal.....	67
Tableau 9 : Résultats du contrôle de stérilité bactérienne et fongique.....	68
Tableau 10 : Résultats du contrôle de la toxicité anormale.....	68
Tableau 11 : Résultats du contrôle d'identité et d'activité du principe actif <i>in vitro</i>	68

Liste des figures

Figure 1 : Structure d'un médicament chimique.....	9
Figure 2 : Structure d'un médicament biologique.....	9
Figure 3 : Rapport entre substances chimique et biologiques (conformation spatiale et leur formule chimique).....	10
Figure 4 : Classification des produits biologiques.....	18
Figure 5 : Classification ATC de niveau 1.....	19
Figure 6 : Classification ATC de niveau 2.....	20
Figure 7 : Classification pharmacologique.....	21
Figure 8 : Classification par aires thérapeutiques.....	22
Figure 9 : Chaîne de valeur du médicament.....	27
Figure 10 : Processus de transcription de l'ADN.....	31
Figure 11 : Colonie des bactéries (<i>Escherichia coli</i>).....	33
Figure 12 : Résumé de la manipulation du plasmide cellulaire.....	34
Figure 13 : Un bioréacteur.....	35
Figure 14 : Appareil d'extraction des protéines.....	36
Figure 15 : Pic chromatographique.....	37
Figure 16 : Structure d'un médicament biologique.....	38
Figure 17 : Résumé du processus de fabrication des biomédicaments.....	39
Figure 18 : Procédé de fabrication du vaccin Hépatite B rADN.....	46

Liste des abréviations

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	- Acide DeoxyriboNucléique
Ag	- Antigène
Ag HBs	- Antigène Hépatite B de surface
ANSM	- Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé
ARN	- Acide Ribonucléique
ARN_m	- Acide Ribonucléique messenger
ARN_t	- Acide Ribonucléique de transfert
BPF	- Bonnes Pratique de Fabrication
BPL	- Bonnes Pratique de Laboratoire
BSA	- Bovine Serum Albumin
cGMP	- current Good Manufacturing Practice
C₂H₃O₂NH₄	- Acétate d'ammonium
CHCl₃	- Chloroforme
Conc	- Concentré
cm	- Centimètre
CMC	- Chemistry, Manufacturing, Control
CuSO₄	- Sulfate de cuivre(II)
Da	- Dalton
EDTA	- Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	- Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMA	- European Medicines Agency
EPO	- Erythropoietin
EU	- European Union
FAO	- Food and Agriculture Organization
FDA	- Food and Drug Administration
G-CSF	- Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GLP	- Good Laboratory Practice
GMP	- Good Manufacturing Practice
H₂SO₄	- Acide sulfurique
HBV	- Hépatite B virus
HCl	- Acide chlorhydrique
HNO₃	- Acide nitrique
HPLC	- High Pressure Liquide Chromatographie
ICH	- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IND	- Investigational New Drug

Liste des abréviations

IPA	- Institut Pasteur d'Algérie
KCl	- Chlorure de potassium
LAL	- Limulus Améboocyte Lysat
LEEM	- Laboratoire d'Economie Expérimentale de Montpellier
LNCPP	- Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques
M	- Molaire
MHLW	- Ministry of Health, Labour and Welfare
ml	- Millilitre
NaOH	- Hydroxyde de sodium (Soude caustique)
NBIC	- Nano-Bio-Info-Cogno
NDA	- Non-disclosure agreement
NMRI	- Naval Medical Research Institute
OGM	- Organismes génétiquement modifiés
pH	- Potentiel d'hydrogène
PE	- Pharmacopée Européenne
PME	- Petite et moyenne entreprise
rADN	- Acide DeoxyriboNucléique recombinant
R&D	- Recherche et Développement
RIA	- Radio-immunological assay
SDS-PAGE	- Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TG	- Thioglycolate
TPO	- Thrombopoïétine
TSB	- Tryptic Soy Broth
µl	- Microlitre
USA	- United States of America
USP	- United States Pharmacopeia
UV	- Ultra-Violet

Introduction générale

Porté par les avancées considérables de la recherche et de la technologie, notre système de soins est en train de vivre une nouvelle révolution. Plusieurs domaines technologiques en interaction ouvrent la voie à une prise en charge renouvelée des maladies : biotechnologies, génomique, imagerie, nanotechnologies, thérapies cellulaires, médecine régénératrice...

Le médicament demeure un élément déterminant des dispositifs de soin et n'échappe pas à ces bouleversements comme en témoigne la place importante prise par les biomédicaments dans l'arsenal thérapeutique.

Faisant appel, directement ou indirectement, aux connaissances sur le vivant, et particulièrement au fonctionnement du génome humain, les biomédicaments, issus de procédés biotechnologiques pour leur recherche et/ou leur production répondent à des besoins importants qui, jusqu'ici, ne pouvaient être qu'imparfaitement satisfaits par les médicaments classiques. Ainsi, la plupart des biomédicaments sont prescrits pour la première fois à l'hôpital et traitent des pathologies à forts besoins médicaux (anti cancéreux immuno-modulateurs, hémostase et endocrinologie).

Le succès des biomédicaments explique la croissance de leurs ventes deux fois plus importante que celle des médicaments classiques. Il trouve sa traduction dans le fait que près du quart des « blockbusters » de l'industrie pharmaceutique mondiale, c'est-à-dire des médicaments générant annuellement plus de 1 milliard de dollars de chiffre d'affaires, sont désormais des biomédicaments.

Or l'Algérie et plus encore l'Afrique ont pris du retard dans leur mise au point et leur production. Le marché est dominé par les firmes américaines, adossées à une recherche académique qui, dans le domaine des sciences du vivant, a été considérée comme une véritable priorité stratégique.

Les biomédicaments génèrent une économie nouvelle et sa chaîne de valeur présente des spécificités.

Le succès de la recherche dépend, en effet, du fonctionnement harmonieux d'un nouvel écosystème du savoir, associant étroitement recherche fondamentale, recherche appliquée, innovation et développement, favorisant ainsi l'apparition et la croissance de PME innovantes (laboratoires 'Start-up'). Ces entreprises sont à l'origine des deux tiers des nouvelles molécules et font mûrir les découvertes scientifiques jusqu'à un stade où elles peuvent être transformées en produits ou services qu'elles commercialiseront ou céderont à des étapes de développement plus ou moins avancé. Dans ce contexte, l'industrie pharmaceutique adopte des stratégies différentes, relevant d'une nouvelle approche de la gestion du risque.

Cette nouvelle organisation du processus de recherche multipartenariale, est profondément différente du modèle antérieur, intégré selon lequel la même entreprise réalise en interne la totalité des étapes depuis la conception de la molécule jusqu'aux expérimentations cliniques. [26]

Introduction générale

Le contenu de l'étude présente une structure axée autour de deux grandes parties principales :

1. La première partie présente le concept de biotechnologie, son évolution et son développement, les principaux domaines technologiques concernés et les principales applications dans le secteur industriel y compris le secteur pharmaceutique.
2. La seconde partie présente une application des médicaments biotechnologiques à savoir le vaccin Hépatite B. Nous nous sommes intéressés à la fabrication de ce biomédicament et nous avons suivi les étapes de contrôle qualité au sein de l'Institut Pasteur d'Algérie.

PARTIE THÉORIQUE

1. BIOTECHNOLOGIE

Biotechnologie

1.1. Historique

La biotechnologie n'est pas que biologie et technologie, il s'agit d'un effort multidisciplinaire mis en place par l'humanité depuis plus de 5 000 ans. Avec les débuts de la culture des plantes, de l'élevage des animaux, de l'élaboration de la bière ou du vin et de la production de fromage, c'était l'application des principes de la biotechnologie au sens large que l'on mettait en place.

En 1919, Karl Ereky, un ingénieur Hongrois, a inventé le terme biotechnologie pour décrire l'interaction entre la biologie et la technologie humaine. Il avait entrevu une nouvelle ère technologique fondée sur l'utilisation de la biologie pour convertir des matières premières en produits utiles à la société. Près d'un siècle plus tard, des milliers de laboratoires pharmaceutiques et de recherche font de cette vision une réalité.

La biotechnologie moderne est née dans les années 1970 en Caroline du Nord et est devenue depuis une industrie à l'échelle mondiale. Amgen, fondée en 1980, a été l'une des premières sociétés à concrétiser les promesses de cette nouvelle discipline en apportant aux patients des médicaments issus de la biotechnologie.

Aux États-Unis, l'un des pays les plus avancés dans ce domaine, l'usage du terme « biotechnologie » englobe aujourd'hui tout un secteur industriel qui crée, développe et commercialise une gamme de produits issus de la manipulation génétique, de la biologie moléculaire ou de l'application contrôlée et dirigée de microorganismes ou de parties de microorganismes.

De nos jours, les secteurs de l'industrie de la biotechnologie sont la santé (biomédicaments, matériel médical, tests diagnostiques), l'agriculture (organismes génétiquement modifiés, sécurité alimentaire), l'industrie et l'environnement (biocarburants, biomatériaux, pollution) et la biodéfense (vaccins, biocapteurs).

Les débuts de la biotechnologie dans le domaine médical remontent déjà à plus de 25 ans. Elle sert essentiellement à la fabrication de principes actifs servant à lutter contre des maladies graves. Le premier principe actif issu de la biotechnologie a été l'insuline, une protéine humaine servant au traitement du diabète et dont la synthèse a pu être transférée à une bactérie, en l'occurrence *Escherichia coli* (E. coli). Ainsi produite, cette protéine a été commercialisée pour la première fois en 1982 aux États-Unis. [4]

1.2. Définition de la biotechnologie

Donner une définition non équivoque de la biotechnologie s'avère difficile car le domaine englobe différentes activités scientifiques et de production. En outre, la biotechnologie couvre une vaste gamme de concepts, technologiques comme scientifiques. Cependant, l'absence d'une définition générale n'a pas freiné la progression du développement biotechnologique.

Biotechnologie

Voici quelques définitions issues de la bibliographie :

Si on reprend l'étymologie, « biotechnologie, il résulte de l'association des mots grecs *bios* (qui a trait à la vie), *technikos* (impliquant les connaissances et compétence humaines) et *logis* (impliquant la maîtrise des outils du vivant) ». [14]

« La biotechnologie est l'utilisation industrielle d'organismes vivants ou de techniques biologiques développées par la recherche fondamentale. Les techniques biotechnologiques comprennent : le génie génétique, les cultures cellulaires, les cultures de tissus, le biotraitement, l'ingénierie des protéines, les biocatalyses, les biosenseurs et la bioingénierie. Les produits biotechnologiques comprennent : les antibiotiques, l'insuline, l'interféron, l'ADN recombinant et les anticorps monoclonaux ». [49]

« La biotechnologie est l'intégration des sciences naturelles et de l'ingénierie afin d'obtenir l'application d'organismes et de cellules (ou des parties de ces derniers) ainsi que d'analogues moléculaires dans la production de biens et de services ». [44]

D'autres définitions vont dans ce sens :

La FAO (Organisation des Nations-Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture) donne deux définitions complémentaires de la biotechnologie:

« L'utilisation de procédés biologiques ou d'organismes vivants pour la production de matières et de services bénéfiques à l'humanité. La biotechnologie implique l'utilisation de techniques qui augmentent la valeur économique des végétaux et des animaux et développent des microorganismes afin d'agir dans l'environnement ».

« La biotechnologie implique la manipulation, sur des bases scientifiques, d'organismes vivants, particulièrement à l'échelle génétique, afin de produire des nouveaux produits tels que les hormones, les vaccins, les anticorps monoclonaux, etc. ». [48]

Certains biotechnologues définissent la biotechnologie comme « une technologie appliquant les potentiels des êtres vivants et leur possibilité de modification sélective et programmée à l'obtention de produits, de biens et de services ». Par conséquent, la biotechnologie regroupe les fondements d'un grand nombre de disciplines, de la biologie classique (taxonomie) à la bioingénierie ou le génie génétique, la microbiologie, la biochimie, la biologie cellulaire et moléculaire, l'immunologie, selon Muñoz.

« En termes généraux, la biotechnologie est l'utilisation de procédés biologiques visant l'obtention de produits utiles, qui incluent des organismes modifiés, des substances et des appareils ». [45]

Le sens donné au terme « biotechnologie » est donc parfois trop limité (manipulation génétique et biologie moléculaire appliquée à l'obtention de biens et de services utiles). Au sens large, la biotechnologie englobe toutes les opérations de la biologie appliquée, de l'agriculture aux sciences culinaires.

Biotechnologie

1.3. Comment la biologie guide la biotechnologie ?

La biotechnologie repose sur la biologie, qui est l'étude de la vie. Les biologistes étudient la structure et les fonctions des cellules, ce que font les cellules et comment elles le font. Les biotechnologistes utilisent ces informations pour développer des produits.

Les chercheurs biomédicaux utilisent leurs connaissances sur les gènes, les protéines et les structures cellulaires pour déterminer les différences entre les cellules malades et les cellules saines.

Lorsque les chercheurs savent en quoi les cellules malades sont altérées et qu'ils apprennent comment intervenir sur ces altérations, ils sont mieux en mesure de développer des diagnostics, des dispositifs et des traitements médicaux innovants.

1.4. Principe de la biotechnologie

L'industrie des biotechnologies repose sur les organismes vivants. La cellule est l'unité de base du vivant. Tous les organismes vivants sont constitués d'une ou de plusieurs cellules. Certains organismes sont unicellulaires, comme les bactéries et les levures. D'autres, comme les êtres humains, sont pluricellulaires et contiennent des milliers de milliards de cellules. Toutes les cellules ont en commun des processus qu'elles effectuent pour leur survie. Les biotechnologies exploitent ces processus pour fabriquer des produits destinés à traiter des maladies et à améliorer la santé des patients.

1.5. Différents domaines d'applications

Le recours à la biotechnologie s'est entre-temps étendu à de nombreux domaines. On parle, de « biotechnologie rouge » en médecine, de « biotechnologie verte » en agriculture, de « biotechnologie bleue » pour l'extraction de produits maritimes et de « biotechnologie blanche » lorsque l'on utilise des procédés naturels à la production industrielle, par exemple la fabrication de produits tels que les biocarburants et les biogaz.

Dans les secteurs de la santé humaine et animale, les biotechnologies s'appliquent à la thérapeutique (nouveaux médicaments), la prévention (vaccins) et le diagnostic (immuno-essais et tests génétiques). Les produits sont obtenus à partir d'organismes génétiquement modifiés. La découverte de nouveaux traitements fait de plus en plus appel aux biotechnologies pour rechercher les causes des maladies, concevoir, tester et produire des médicaments spécifiques.

La médecine régénérative, qui a pour objectif de créer des tissus vivants fonctionnels permettant de remplacer des tissus ou des organes endommagés ou de remédier à des maladies congénitales, où les biotechnologies offrent de nombreuses perspectives en couplant

Biotechnologie

nanotechnologies et biologies dans les domaines des biocapteurs et des laboratoires sur puces.

La biologie de synthèse, fondée sur les convergences entre nanotechnologies, sciences de la vie et de l'information nommées convergences NBIC (Nano-Bio-Info-Cogno), a pour applications le secteur de la bio-production (bio-fuels, matériaux issus de la pétrochimie, ingrédients alimentaires...), la sécurité avec les bio-senseurs pour la lutte contre le bioterrorisme, les biomatériaux ou « matériaux intelligents ».

Les biotechnologies blanches utilisent des organismes vivants (champignons, levures, bactéries, plantes) et des enzymes pour synthétiser des produits chimiques. Les industries concernées sont très nombreuses : production d'enzymes pour différents secteurs industriels (fabrication de produits alimentaires, de détergents, de pâte à papier, traitement des textiles), plastiques biodégradables, biomatériaux, chimie, biocarburants.

Les industries alimentaires mettent aussi en œuvre des procédés biotechnologiques : fermentation in situ en milieu hétérogène grâce à des bactéries et à des levures, ainsi que des apports d'enzymes souvent issues de cultures de microorganismes génétiquement modifiés.

Pour les sciences de l'environnement, les industries en charge du traitement des eaux résiduaires, du traitement des déchets et de la remédiation des sols sont concernés, et plus particulièrement du fait des pouvoirs épurateurs des micro-organismes. Les biotechnologies permettent la mise au point de capteurs de l'état de l'environnement, de sa pollution par des substances chimiques.

Les biotechnologies participent à développer une nouvelle agriculture en travaillant sur les semences, en particulier via les organismes génétiquement modifiés (OGM), la sélection d'animaux et la protection des végétaux par la lutte biologique.

Pour la culture cellulaire, la valorisation industrielle des microalgues offre des possibilités nouvelles de développement. [29]

2. MÉDICAMENT

Médicament

2.1. Définitions

Le médicament n'est pas un produit comme les autres, il contient des substances actives :

- qui peut se révéler toxiques à des doses très variables suivant l'affection, l'âge et le poids du malade.
- Il peut présenter un risque d'allergie ou être interdit en association avec d'autres médicaments.
- Il peut entraîner des effets secondaires ou de façon imprévisible des accidents graves.
- Il peut être contre-indiqué dans certains états et pour certaines maladies.
- Son emploi peut nécessiter une surveillance étroite de certaines constantes biologiques de l'organisme.
- Son usage trop répété peut parfois conduire à une accoutumance.
- Il peut être détourné de son usage normal à des fins de dopage ou de toxicomanie. [46]

En Algérie, la définition légale du médicament a été donnée par l'article 170 de la loi sanitaire N° 85/05 du 16/02/85 relative à la protection et à la promotion de la santé :

« On entend par médicament, toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, tous produits pouvant être administrés à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques» [43]

L'article 4 de la loi N° 08-13 du 20/07/08 a modifié et complété l'article 170 de la loi sanitaire N° 85/05 du 16/02/85 relative à la protection et à la promotion de la santé, il a donné une définition plus élargie que la précédente.

L'article 170 de la loi sanitaire N° 85/05 du 16/02/85 a été modifié et complété comme suit :

« On entend par médicament, au sens de la présente loi :

- Toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, et tous produits pouvant être administrés à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger et modifier ses fonctions organiques.
- Toute préparation magistrale de médicament préparé extemporanément en officine en exécution d'une prescription médicale.
- Toute préparation hospitalière préparée sur prescription médicale et selon les indications d'une pharmacopée en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique ou médicament générique disponible ou adapté, dans la pharmacie d'un établissement de santé et destiné à y être dispensé à un ou plusieurs patients.

Médicament

- Toute préparation officinale de médicament préparé en officine selon les indications de la pharmacopée ou du formulaire national des médicaments et destinée à être dispensée directement au patient.
- Tout produit officinal divisé défini comme étant toute drogue simple, tout produit chimique ou toute préparation stable indiquée dans la pharmacopée, préparée à l'avance par un établissement pharmaceutique qui assure sa division au même titre que l'officine ou la pharmacie hospitalière.
- Toute spécialité pharmaceutique préparée à l'avance présentée selon un conditionnement particulier et caractérisée par une dénomination spéciale.
- Tout générique qui a la même composition qualitative et quantitative en principe(s) actif(s), la même forme pharmaceutique sans indications nouvelles et qui est interchangeable avec le produit de référence du fait de sa bioéquivalence démontrée par des études appropriées de biodisponibilité.
- Tout allergène qui est tout produit destiné à identifier ou provoquer une modification spécifique acquise de la réponse immunitaire à un agent allergisant.
- Tout vaccin, toxine ou sérum qui sont tout agent destiné à être administré à l'homme dans le but de provoquer une immunité active ou passive ou en vue de diagnostiquer l'état d'immunité.
- Tout produit radio pharmaceutique prêt à être administré à l'homme et qui contient un ou plusieurs radionucléides.
- Tout produit stable dérivé du sang.
- Tout concentré d'hémodialyse ou solutés de dialyse péritonéale.
- Les gaz médicaux. » [42]

2.2. Classification des médicaments

▪ Classification selon le mode de fabrication du médicament

- Médicaments synthétiques

C'est le type de médicaments les plus connus, tels que l'aspirine. Ce sont généralement des molécules complexes obtenues par des méthodes de synthèse de chimie organique.

C'est la principale source de production des médicaments modernes.

- Médicaments semi-synthétiques

Sont les médicaments obtenus par modification ou par transformation chimique d'une molécule déjà connue d'origine naturelle pour aboutir à de nouvelles molécules (Hémi synthèse), on part d'une molécule naturelle et on la modifie. [27]

Exemple : Digitaline → Digoxine.

Médicament

- ❖ Alors que l'industrie pharmaceutique produit traditionnellement des médicaments synthétiques, la révolution des biotechnologies a donné naissance à des médicaments d'un nouveau genre comme les médicaments biologiques (ou biomédicaments).

▪ Classification selon l'origine du médicament

- Médicaments chimiques

Un médicament chimique est un mélange de nombreuses espèces chimiques. Il contient un ou plusieurs principes actifs (substance active connue pour prévenir ou guérir une maladie) et des excipients (désigne toute espèce chimique présente dans la composition du médicament autre que le principe actif). [27]

- Médicaments biologiques (ou biomédicaments)

À la différence des médicaments 'classiques', produits à partir de molécules chimiques relativement simples, les médicaments biologiques sont produits à partir des cellules ou dérivés d'organismes vivants.

Les médicaments biologiques regroupent plusieurs familles de médicaments confectionnés grâce à la synthèse d'organismes vivants ou de leur substance et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physico-chimico-biologiques, ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle. On utilise des éléments naturels tels le sang, les animaux, les bactéries, les plantes et même les virus pour les produire. Si, pour produire le médicament, tout ou partie d'une cellule est utilisé, il s'agit d'un médicament biologique, aussi appelé biomédicament. En gros, ce sont des médicaments produits par la biologie.

Au final, ces médicaments sont plus complexes, les molécules sont environ 400 fois plus grosses que les autres et nécessitent plus d'étapes de fabrication.

Ces structures ne peuvent pas être obtenues par la chimie de synthèse. Alors qu'à partir d'une voie de synthèse chimique classique on obtient une population moléculaire homogène et reproductible du même principe actif, à partir d'un système de production biologique, c'est une population mixte de la molécule active sous des formes variantes qu'est obtenue, compte tenu de la complexité des processus biologiques.

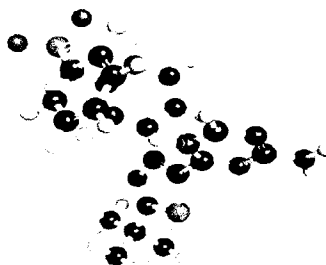


Figure 1 : Structure d'un médicament chimique



Figure 2 : Structure d'un médicament biologique

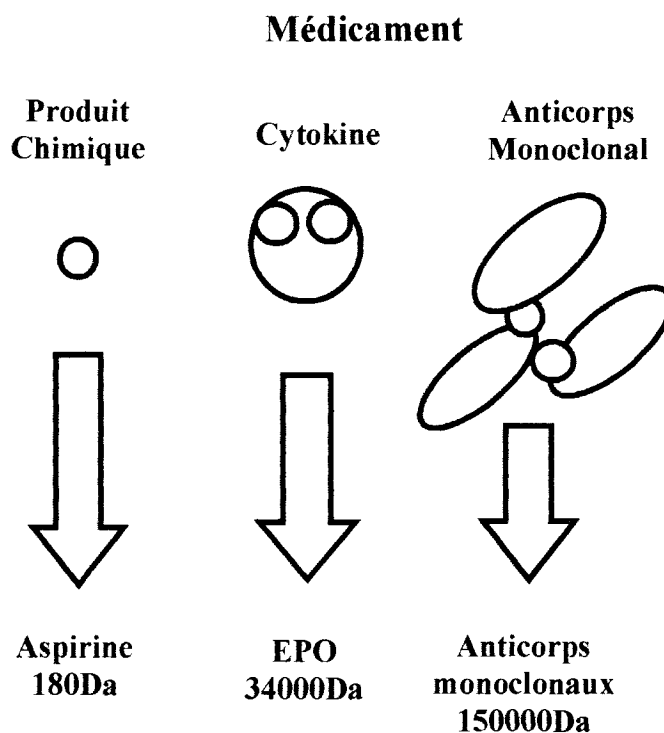


Figure 3 : Rapport entre substances chimiques et biologiques (conformation spatiale et leur formule chimique)

2.3. Médicaments génériques

C'est une copie d'un médicament princeps, mais pas nécessairement une copie strictement identique. Il doit avoir la même composition qualitative et quantitative en principe(s) actif(s), la même forme pharmaceutique (à noter, les comprimés et les gélules à action immédiate sont considérés comme une même forme pharmaceutique) que la spécialité de référence (encore appelée médicament original) et démontrer son équivalence thérapeutique avec cette dernière, c'est-à-dire démontrer qu'il se comporte de la même manière dans l'organisme.

Il peut présenter des différences, à condition qu'elles n'affectent pas la bioéquivalence du médicament générique par rapport au médicament de référence, seule garantie d'une activité thérapeutique et d'une sécurité identiques. En d'autres termes, ces différences ne doivent pas modifier la quantité et la vitesse auxquelles le principe actif est libéré dans l'organisme. [10]

2.4. Médicaments biosimilaires

Un médicament biosimilaire est similaire à un médicament biologique dit de référence déjà autorisé sur le marché. Tout médicament biologique dont le brevet est tombé dans le domaine public peut être copié. Cette copie est désignée comme biosimilaire. Les produits biosimilaires ne pouvant être strictement identiques au produit de référence, leur emploi ne peut être le même que celui de génériques des médicaments chimiques.

Les médicaments biologiques similaires à des médicaments de référence ne remplissent jamais toutes les conditions pour être considérés comme des médicaments génériques, en raison notamment des caractéristiques des procédés de fabrication, des matières premières

Médicament

utilisées, des caractéristiques moléculaires et des modes d'action thérapeutiques. Dès lors qu'un médicament biologique ne peut être considéré comme un médicament générique, les résultats d'essais appropriés doivent être fournis afin de satisfaire aux conditions relatives à la sécurité (essais précliniques) ou à l'efficacité (essais cliniques), ou aux deux. [29]

2.5. Différences entre un médicament générique et un médicament biosimilaire

Le générique est un médicament chimique, le biosimilaire est un médicament issu des biotechnologies.

Le générique présente la même composition quantitative et qualitative en principes actifs et la même forme pharmaceutique. Il présente en outre une bioéquivalence avec la spécialité de référence démontrée par des études de biodisponibilité.

Le biosimilaire a les mêmes caractéristiques que le produit de référence :

- principe actif,
- propriétés physico-chimiques,
- propriétés biologiques,
- forme pharmaceutique
- équivalence en termes d'innocuité et d'efficacité.

Le développement des génériques repose sur des études de bioéquivalence alors que celui des biosimilaires s'appuie sur des études précliniques et cliniques (phases I, III et IV). Le générique est substituable alors que le biosimilaire ne l'est pas.

La prescription des génériques repose sur la visite médicale et celle des biosimilaires nécessite la prescription par un médecin spécialiste. [10]

Tableau 1 : Données requises pour l'évaluation d'un produit générique et d'un produit biosimilaire. (CMC : Chemistry, Manufacturing, Control.)

	Générique	Biosimilaire
CMC - information standard	+	+
CMC - comparabilité	-	+
Données non-cliniques	-	+
Bioéquivalence clinique	±	+
Efficacité clinique	-	+
Sécurité clinique	-	+

Médicament

Il a ainsi été nécessaire de développer une approche spécifique pour évaluer les copies des médicaments biologiques, sans leur imposer toutefois le développement complet que l'on attend pour une nouvelle molécule. Cette approche est résumée sous le terme de « médicament biologique similaire à un médicament de référence ». [6]

2.6. Particularités des traitements biotechnologiques

Les particularités des traitements biotechnologiques sont données sur le tableau ci-dessous.

Médicament

Tableau 2 : Caractéristiques des traitements conventionnels et biotechnologiques, y compris les conséquences sur la distribution du produit.

	Traitements Conventionnels	Traitements Biotechnologiques
Fabrication	Fabrique par synthèse chimique	Fabrique par une cellule vivante, lignée cellulaire unique provenant de bactérie ou mammaire, protéines recombinantes
Structure	Structure définie et facile à caractériser	Structure hétérogène, difficile à caractériser, mélange de molécules
Stabilité	Relativement stable	Variable ; sensible aux conditions externes
Administration	Habituellement pris par voie orale et prescrit par un médecin généraliste	Habituellement injecté et prescrit par des médecins spécialistes
État des impuretés	Bien connues	Profil d'impureté est complexe
Secteur intéressé	En général, le secteur de la médecine générale	Généralement le secteur hospitalier
Coût production	En général plus bas. Elevé à travers les processus de fabrication chimique.	En général, plus élevé. Complexité de la fabrication bio.
Prix	En général, moins élevé.	En général, plus élevé.
Logistique des forces de ventes	Force de vente importante pour toucher le secteur des médecins généralistes	Force de vente minimale / fragmentée pour toucher le petit nombre de médecins spécialistes dans les hôpitaux
Pénétration des génériques	L'industrie du générique s'est positionnée exclusivement sur les petites molécules.	Très limitée. Apparition d'une possibilité pour les protéines thérapeutiques via les « biosimilaires ».

Médicament

2.7. Risques liés aux biomédicaments

Dans le cas des préparations issues de la biotechnologie, il faut savoir que des différences cliniquement pertinentes peuvent même apparaître entre des « produits biologiques » de référence de même composition mais provenant de différents fabricants. Il peut en aller de même entre différents lots de la même préparation (de référence), surtout lors d'une modification du procédé de fabrication, comme par exemple, lors d'un changement du site de production ou lors d'une modification du procédé de production.

La lignée cellulaire servant à la synthèse de la protéine humaine peut elle aussi présenter des variations minimales susceptibles d'entraîner des différences cliniquement pertinentes.

Une réaction d'intolérance constitue un risque inévitable pour toutes les préparations issues de la biotechnologie.

Ce risque est lié aux protéines contenues dans ce type de médicaments par principe, les protéines sont susceptibles de déclencher des réactions allergiques.

L'injection de protéines dans le corps peut donc conduire à l'activation du système immunitaire, ce qui signifie que la protéine est reconnue comme étrangère par l'organisme et qu'il essaie de l'éliminer ou de s'y opposer.

Une réaction immunitaire est par exemple observable suite à une piqûre d'abeille. Le venin de l'abeille, une protéine, est inoculé dans le corps lors de la piqûre. Considérant cette protéine comme étrangère, le corps s'y oppose par une réaction immunitaire (enflure, rougeur, douleur).

Dans le cas des médicaments issus de la biotechnologie, l'activation du système immunitaire peut conduire à la formation dans le sang d'anticorps appelés neutralisants susceptibles d'inactiver le médicament.

Ce risque existe avec toutes les protéines. Pour y faire face, les autorités de régulation des différents pays exigent d'importantes mesures visant à minimiser les risques.

Un système de notification périodique des effets indésirables est mis en place par l'autorité de réglementation afin de pouvoir évaluer en permanence le rapport bénéfice-risque des médicaments issus de la biotechnologie.

Il est exigé de la société distributrice qu'elle prévoie un plan spécifique décrivant la marche à suivre au cas où un effet indésirable en relation avec l'immunogénicité devait survenir.

Par ailleurs, il est exigé de la société distributrice qu'elle mette en place un système de surveillance des effets indésirables permettant d'enregistrer et de classer tous les effets indésirables en relation avec le traitement. [29]

Médicament

2.8. Avenir des médicaments biotechnologiques

▪ Médecine personnalisée

La médecine personnalisée est le concept selon lequel les patients doivent être traités au moyen de médicaments et de thérapies reposant spécifiquement sur la constitution génétique unique de chaque patient afin d'obtenir des résultats optimaux.

▪ La thérapie génique ou gènothérapie

La thérapie génique utilise des acides nucléiques (ADN ou ARN) pour soigner ou prévenir des maladies. Selon la pathologie, cet objectif peut être atteint en délivrant aux cellules un gène fonctionnel qui remplace le gène défectueux à l'origine de la maladie (transgène), un gène à action thérapeutique, ou encore de l'ARN capable de réguler ou bloquer partiellement l'expression d'un gène altéré. Ces acides nucléiques sont le plus souvent transportés dans les cellules du patient grâce à un vecteur viral, mais ils peuvent également être injectés directement dans les cellules, sous forme d'ADN nu.

▪ La thérapie cellulaire

C'est la prévention ou le traitement des pathologies humaines par l'administration de cellules choisies (cellules souches), multipliées et traitées ou modifiées en dehors du corps (*ex vivo*) grâce à leur plasticité (capacité à se transformer en différents types de cellules).

La thérapie par cellules souches, qui en est encore aux stades expérimentaux, nécessite de cultiver les cellules souches en laboratoire et de les orienter vers le type cellulaire souhaité en leur fournissant différents facteurs de croissance. Les cellules différenciées sont ensuite implantées par voie chirurgicale. La théorie est que les cellules souches peuvent ensuite s'intégrer dans le tissu malade, remplacer les cellules atteintes et inverser les effets de la maladie.

Il est également envisageable de concevoir des thérapies cellulaires dans lesquelles des cellules souches indifférenciées seraient implantées avec des facteurs de croissance pour guider leur différenciation dans l'organisme du patient. L'objectif est de remplacer les cellules endommagées par des cellules saines, exemptes de la maladie d'où le nom de « médecine régénérative » donné à cette approche. L'espoir est que les cellules souches, incitées à se différencier en des types cellulaires spécifiques, puissent constituer une source renouvelable de cellules et de tissus de remplacement servant à traiter un large éventail de maladies.

▪ Nanotechnologies

Les nanotechnologies reposent sur la manipulation de molécules et de structures à l'échelle nanométrique (un milliardième de mètre) ou échelle atomique. L'application des nanotechnologies à l'amélioration de la santé humaine est appelée nanomédecine qui utilise des organismes vivants et/ou leurs composants à très petite échelle.

Un exemple d'application de la nanomédecine est l'utilisation expérimentale de nanobilles pour cibler sélectivement et détruire les cellules cancéreuses au niveau cellulaire.

Médicament

Les nanobilles sont des lentilles métalliques nanoscopiques qui atteignent sélectivement des organes ou des tumeurs spécifiques via la circulation sanguine. Elles ont la capacité de capturer la lumière infrarouge qui traverse la peau d'un patient cancéreux et de la convertir en chaleur, ce qui permet de détruire seulement les cellules cancéreuses ciblées.

▪ Nouveaux systèmes de délivrance des médicaments

Les chercheurs biomédicaux étudient de nouveaux moyens de délivrance des médicaments dans l'organisme qui pourraient améliorer leur efficacité. Un exemple est le développement de particules microscopiques appelées microsphères qui comportent des trous minuscules justes assez grands pour transporter et délivrer les médicaments à leurs cibles. Les microsphères sont constituées de matériaux qui ressemblent à des lipides présents naturellement dans les membranes cellulaires. Elles sont administrées par pulvérisation dans le nez ou la bouche.

Des traitements utilisant des microsphères sont d'ores et déjà disponibles pour le cancer du poumon et certaines maladies respiratoires. Des recherches sont également en cours sur l'utilisation de microsphères pour transporter des médicaments anticancéreux jusqu'aux tumeurs actives et sur leur utilisation avec des anesthésiques dans la prise en charge de la douleur. [4]

3. BIOMÉDICAMENTS

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

Les progrès des connaissances en biologie moléculaire et les avancées en biotechnologies conduisent aux évolutions d'un vaste ensemble comprenant de nouveaux outils d'aide à la recherche, des outils de diagnostic de nouveaux systèmes de délivrance de principes actifs et des médicaments biotechnologiques. Ces derniers, portés par une démarche plus rationnelle, occupent une part croissante dans l'arsenal thérapeutique.

3.1. Classification des produits biologiques

Il est possible de trouver différents groupes de produits biologiques : les substances d'extraction biologique (hormones, enzymes, protéines plasmatiques, antibiotiques, allergènes), les vaccins, les thérapies cellulaires et tissulaires, les protéines recombinantes (ADN recombinant) issues du génie génétique, les acides nucléiques (oligonucléotides, thérapies géniques, vaccins à ADN).

Ces différents groupes sont représentés dans la figure ci-dessous.[25]

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

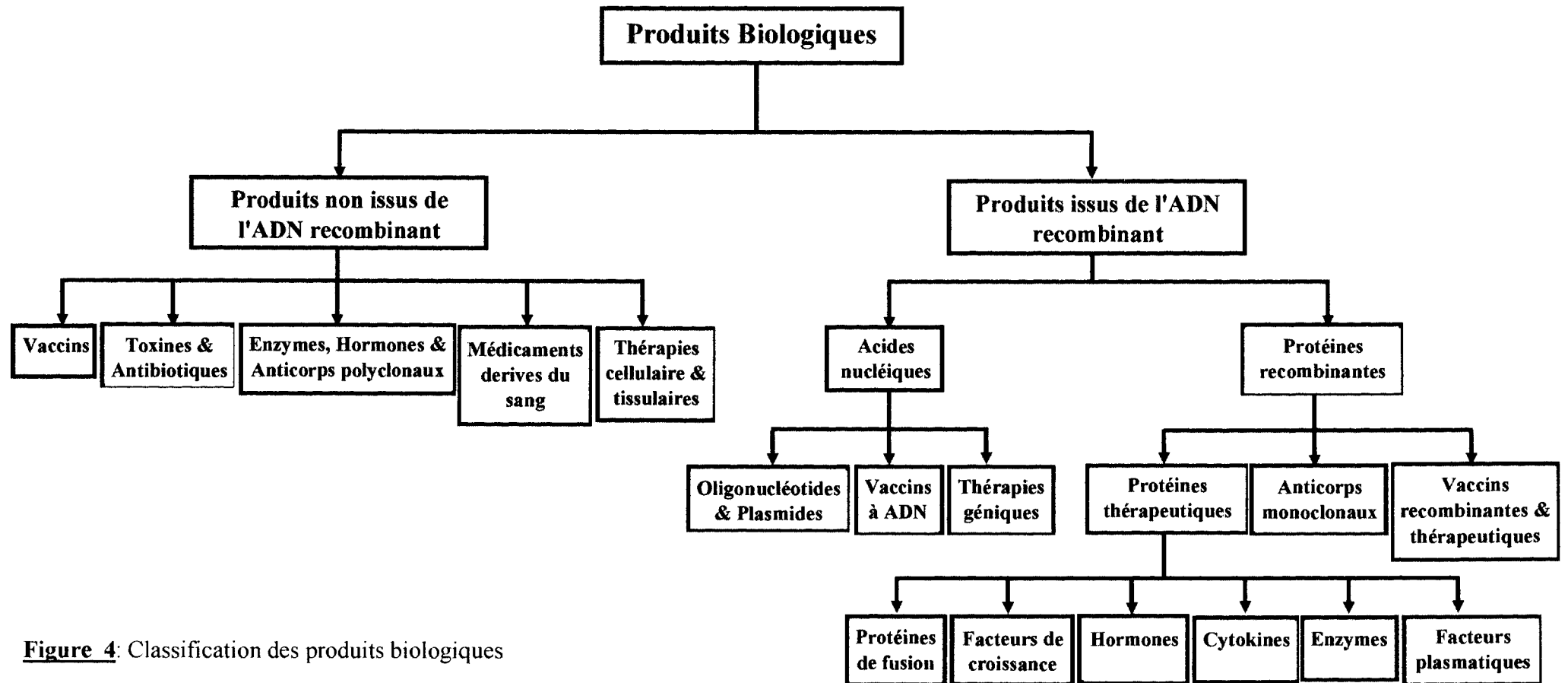


Figure 4: Classification des produits biologiques

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

3.1.1. Classification Anatomical Therapeutic Chemical (ATC)

Le système ATC (Anatomical Therapeutic Chemical) est une classification internationale des médicaments. Cette classification, est réalisée et donnée par l'Organisation Mondiale de la Santé, où les médicaments sont subdivisés en quatorze groupes principaux sur la base de l'organe ou du système sur lequel ils agissent. Ils sont ensuite répartis sur la base de leurs propriétés chimiques, pharmacologiques et thérapeutiques en quatre niveaux supplémentaires. [24]

▪ Classement ATC niveau 1

La classification ATC de niveau 1 (Figure 5) indique que la classe la plus représentée est celle des anti-infectieux à usage systémique (J) avec 36 % des 173 biomédicaments commercialisés en France. [24]

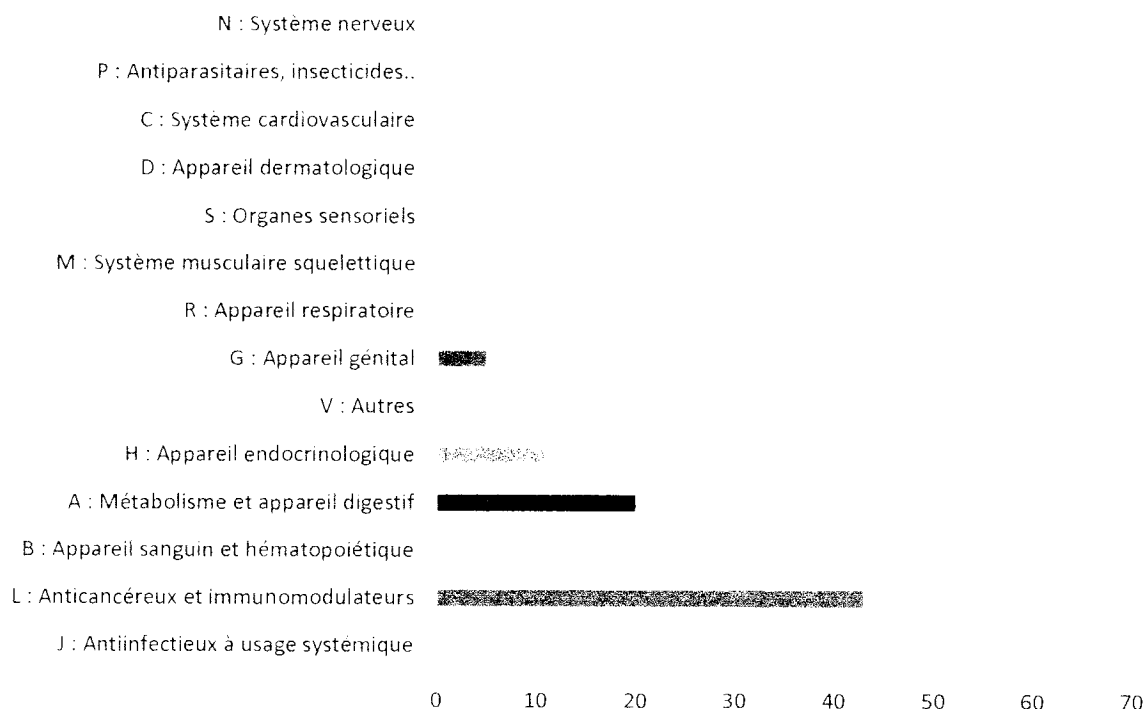


Figure 5 : Classification ATC de niveau 1 des 173 biomédicaments commercialisés en France au 31 mai 2014

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

▪ Classement ATC niveau 2

La classification ATC de niveau 2 (Figure 6) permet de préciser leurs propriétés pharmacologiques. Ainsi, la classe anti-infectieuse à usage systémique (J) est composée majoritairement de vaccins (J07) à hauteur de 97 %. Ce classement montre la prédominance des vaccins dans les biomédicaments avec 60/173 biomédicaments, soit 35 %. [24]

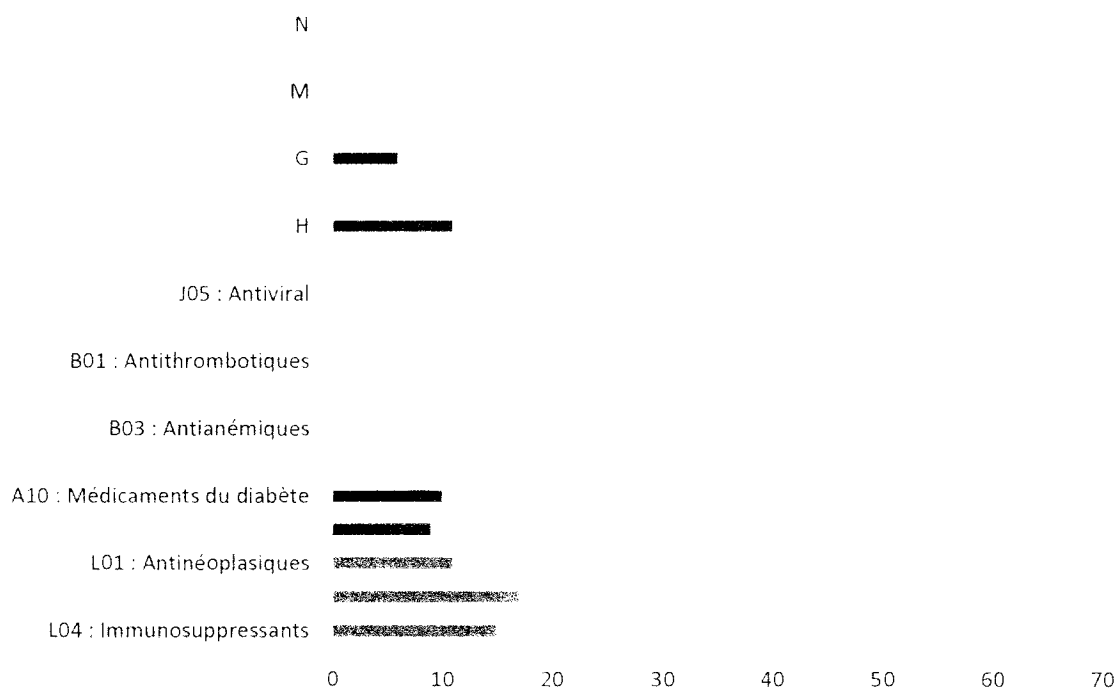


Figure 6 : Classification ATC de niveau 2 des 173 biomédicaments commercialisés en France au 31 mai 2014

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

3.1.2. Classification pharmacologique des biomédicaments

La classification pharmacologique différencie les biomédicaments en fonction de leur nature. Elle permet de regrouper les médicaments en grandes familles pharmacologiques.

Les 173 biomédicaments disponibles sur le marché français se répartissent en neuf classes pharmacologiques majeures. Dans les classes les plus représentées, il y a les vaccins (35 %), les anticorps monoclonaux (17 %), les facteurs de croissance (9 %), les hormones (9 %) et les enzymes (8 %). Ces cinq classes majoritaires représentent 78 % des biomédicaments sur le marché français. [24]

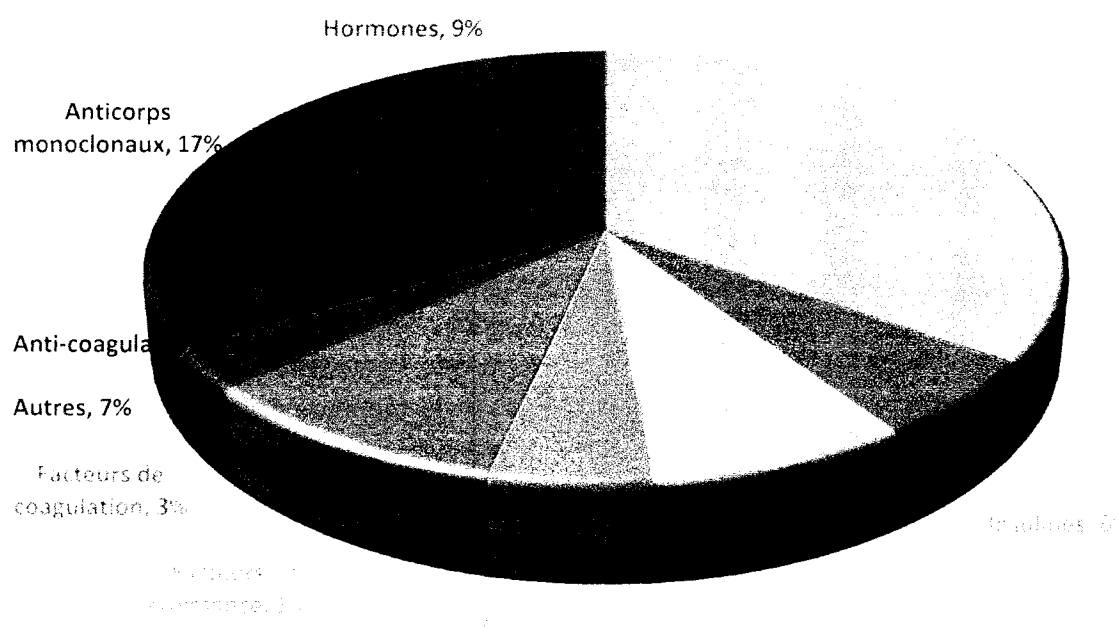


Figure 7 : Classification pharmacologique des 173 biomédicaments commercialisés en France au 31 mai 2014

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

3.1.3. Classification par aires thérapeutiques des biomédicaments

La classification par aires thérapeutiques prend en compte toutes les aires thérapeutiques ciblées par chacun des médicaments. Un médicament peut donc ici être comptabilisé plusieurs fois quand il cible différentes aires thérapeutiques. En effet, une nouvelle indication thérapeutique peut être découverte à un biomédicament, le plus souvent aux anticorps monoclonaux. Prenons l'exemple de Mabthera® (rituximab) qui a obtenu des indications thérapeutiques en Oncologie/Hématologie mais également en Rhumatologie.

Cette classification permet d'avoir pour chaque aire thérapeutique une vision réelle des réponses biothérapeutiques disponibles.

Par souci de cohérence avec les indications et les aires thérapeutiques renseignées par le Vidal et l'EMA, les biomédicaments ayant obtenu plusieurs indications thérapeutiques seront classés dans l'ensemble des aires thérapeutiques correspondantes.

L'ensemble des biomédicaments cible seize aires thérapeutiques. Les six aires thérapeutiques majeures sont : l'Infectiologie avec 30 %, l'Oncologie/Hématologie avec 17 %, l'Hémostase avec 14 %, la Rhumatologie avec 7 %, la Diabétologie avec 5 %, l'Endocrinologie avec 4 %. [24]

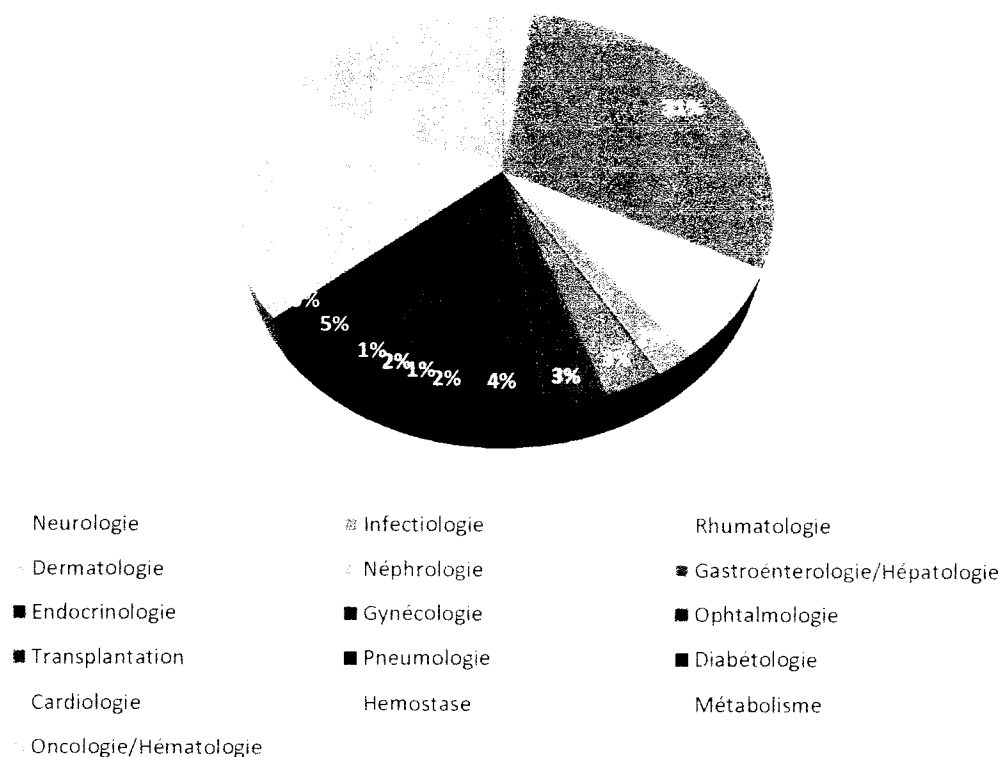


Figure 8 : Classification par aires thérapeutiques des 173 biomédicaments commercialisés en France au 31 mai 2014

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

3.2. Enjeux du biomédicament

- **Le biomédicament prend une importance croissante aux côtés d'autres « thérapies innovantes »**

Les progrès des connaissances en biologie moléculaire et les avancées en biotechnologies conduisent aux évolutions d'un vaste ensemble comprenant de nouveaux outils d'aide à la recherche, des outils de diagnostic (séquençage des gènes, biopuces pour les tests ADN), de nouveaux systèmes de délivrance de principes actifs et des médicaments biotechnologiques.

Ces nouvelles voies thérapeutiques et technologiques représentent une mutation de grande ampleur dans la dynamique d'innovation pharmaceutique.

L'importance des biomédicaments dans l'arsenal thérapeutique peut s'illustrer par la progression de leur marché, 17 % par an, et par leur importance dans l'ensemble des médicaments disponibles, 15 % en 2012. De plus, 70 % des biomédicaments traitent des pathologies à forts besoins médicaux, 63 % sont prescrits pour la première fois à l'hôpital (anti cancéreux et immuno-modulateurs, hémostase et endocrinologie), 30 % des nouvelles molécules sont des biomédicaments et 75 % ont moins de 10 ans. Enfin, alors que le rendement de la R&D classique de l'industrie pharmaceutique ne cesse de décroître, le taux de succès des recherches est trois fois supérieur pour un biomédicament à celui d'un produit classique.

- **Le biomédicament est emblématique de questionnements et d'enjeux globaux, notamment sur la recherche et l'innovation**

Les biomédicaments représentent d'abord un enjeu en termes de politique de la santé car ils sont développés dans des classes thérapeutiques majeures pour lesquelles les besoins sont insuffisamment ou non couverts par les produits classiques.

Les biomédicaments représentent un enjeu au regard des objectifs d'une «économie de la connaissance» car leur découverte dépend d'une recherche de haut niveau, faisant appel à des qualifications élevées pour mettre au point des produits de haute valeur ajoutée.

Les biomédicaments représentent un enjeu économique. S'ils sont issus de la recherche nationale ou produits sur le territoire national, ils développent la croissance et l'emploi. À défaut, ils représentent une charge dans les dépenses de santé.

Les biomédicaments interpellent également la société au regard de la pérennité du système de protection sociale. Des recherches doivent être menées pour réduire le prix important de ces nouveaux produits car les principes d'équité et de solidarité doivent conduire à ce que tous puissent bénéficier de ces progrès de la science.

Enfin, la recherche, la mise au point et la fabrication des biomédicaments font appel à l'utilisation de matériel biologique et à la transgénèse et donc soulèvent des questions de société relatives à la protection de l'environnement, à la sécurité des personnes ainsi qu'à des questions éthiques.

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

- **Le biomédicament interroge les processus de recherche et les articulations entre différents acteurs**

La connaissance des processus intimes de fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire permet de modéliser et de simuler l'évolution des maladies et donc d'adopter une approche plus rationnelle dans la mise au point d'un médicament.

La réussite de ce processus dépend d'abord du foisonnement des découvertes dans toutes les disciplines de la recherche fondamentale, puis de la capacité à détecter et valoriser les résultats susceptibles de déboucher sur une innovation. Les projets prometteurs issus de cette recherche, souvent développés par des «start-up», ont besoin d'une phase de maturation plus ou moins longue afin de démontrer un résultat chez l'homme avant de passer à la phase de production et de commercialisation. Cela conduit à la multiplication des acteurs tout au long du processus.

Cette organisation de la recherche sur les biomédicaments est profondément différente du modèle classique dans lequel le même laboratoire réalise, dans son centre de recherche, la synthèse chimique d'un nouveau produit, les tests de screening, de toxicité et les premières démonstrations d'activité avant d'organiser les essais cliniques à l'hôpital.

La mise au point des nouveaux médicaments dépend désormais de la coopération entre les composantes d'un triangle vertueux : recherche fondamentale/valorisation et maturation/industrie pharmaceutique. Il faut donc développer le processus de mise en réseau et de partenariats.

- **Les biomédicaments sont un élément structurant de la mutation du modèle économique de l'industrie pharmaceutique**

À ces évolutions dues au changement de paradigme scientifique s'ajoutent celles dues aux modifications du contexte économique et des modèles de développement. Les groupes pharmaceutiques sont confrontés aujourd'hui à un risque de ralentissement de leur croissance et à une banalisation de leur relative rentabilité sous l'impact de nombreux facteurs :

- fin de la protection par brevets pour de nombreux médicaments se traduira, à court terme, par de fortes pertes de chiffres d'affaire suite à la mise sur le marché de génériques ;
- essoufflement des « blockbusters » malgré des stratégies commerciales agressives ;
- saturation des marchés de soins primaires (soins essentiels relevant de la médecine générale) où l'impact commercial est maximal ;
- pouvoirs croissants des autorités réglementaires et des organismes payeurs.

Cette industrie est également confrontée à un changement des méthodes de production car la fabrication d'un biomédicament relève de processus radicalement différents d'un processus chimique, nécessite des installations complexes et coûteuses dont la conduite est particulière au regard d'une organisation industrielle traditionnelle.

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

Une nouvelle organisation des firmes pharmaceutiques, très différente du modèle intégré antérieur, se met en place. Aujourd'hui les grands groupes pharmaceutiques entretiennent de nombreuses relations avec d'autres firmes, plus petites et spécialisées dans l'une des étapes du processus, et des institutions de recherche. Ils multiplient les alliances, achats d'innovation (molécules ou sociétés), mettent en place de nouvelles organisations de la recherche et parfois encouragent la création de sociétés secondaires. Cette mise en réseau, sous forme de partenariat, dans certains cas par externalisation d'activités, touche progressivement l'ensemble de la chaîne de valeur du médicament : recherche, développement, production, commercialisation. [26]

3.3 Intérêt du recours aux biomédicaments

Les médicaments issus de la biotechnologie ont permis une meilleure qualité de vie :

- Nouvelles armes thérapeutiques plus efficaces pour des maladies mal ou non traitées
- Des traitements mieux ciblés pour la réduction des effets secondaires
- Mise en place de nouveaux concepts thérapeutiques
- Traitements moins lourds
- Réduction du coût relatif aux soins de santé
- Diminution des besoins en chirurgie et en hospitalisation
- La complexité de certains principes actifs rend par ailleurs impossible leur fabrication par synthèse chimique. L'insuline, l'interféron, les vaccins, les hormones de croissance ou les facteurs de coagulation sont des substances de ce type.
- les autorités sanitaires ont de nouvelles exigences pour autoriser la mise sur le marché des nouvelles molécules.

La biotechnologie offre aux patients de meilleurs et de plus nombreux choix thérapeutiques.

De nouveaux traitements et diagnostics innovants sont en train de révolutionner les méthodes de prévention ou de traitement de certaines maladies humaines.

Ce changement radical dans le domaine de la santé n'en est qu'à ses débuts, et de nouveaux médicaments, diagnostics et technologies en cours de développement sont porteurs d'un fort potentiel pour améliorer la vie des patients.

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

3.4. Aspects réglementaires

3.4.1. Développement d'un biomédicament

Le marché du médicament et par extension l'industrie de la santé dans sa globalité, est un des secteurs le plus réglementé actuellement. Cela implique une organisation complexe et l'internationalisation du marché n'a pas aidé à la rendre plus compréhensible. Les autorités de santé sont nombreuses et leurs rôles et juridictions peuvent être assez nébuleux pour la majorité des gens. Au niveau international, les acteurs prépondérants sont la Food and Drug Administration (FDA) qui est l'autorité de santé aux États-Unis, l'European Medicines Agency (EMA) celle de l'Europe, et le Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) celle du Japon. Bien que chaque pays en Europe et dans le reste du monde ait son propre système de régulation de la santé, par exemple le Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière (MSPRH) en Algérie, ces organismes promulguent les recommandations les plus drastiques en matière de développement de médicament ce qui incite les industriels ayant la volonté de mettre sur le marché international un nouveau médicament à se conformer aux textes de ces différentes agences.

Afin de savoir à quels textes se reporter lors du développement d'un médicament, il est crucial de définir le cadre réglementaire du candidat.

La première caractéristique à évaluer est la nature et le moyen de production du principe actif. Un médicament produit par système cellulaire, du fait de l'utilisation d'un organisme vivant comme base de système de production et sa nature protéique, est classé dans les médicaments biologiques ou dérivés des biotechnologies, par opposition aux principes actifs synthétisés chimiquement.

La deuxième caractéristique importante est la nature de l'indication du principe actif, selon que le candidat soit indiqué pour le traitement de cancers, une maladie pandémique ou une maladie non traitable, les textes de lois et les études à mener seront différents.[31]

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

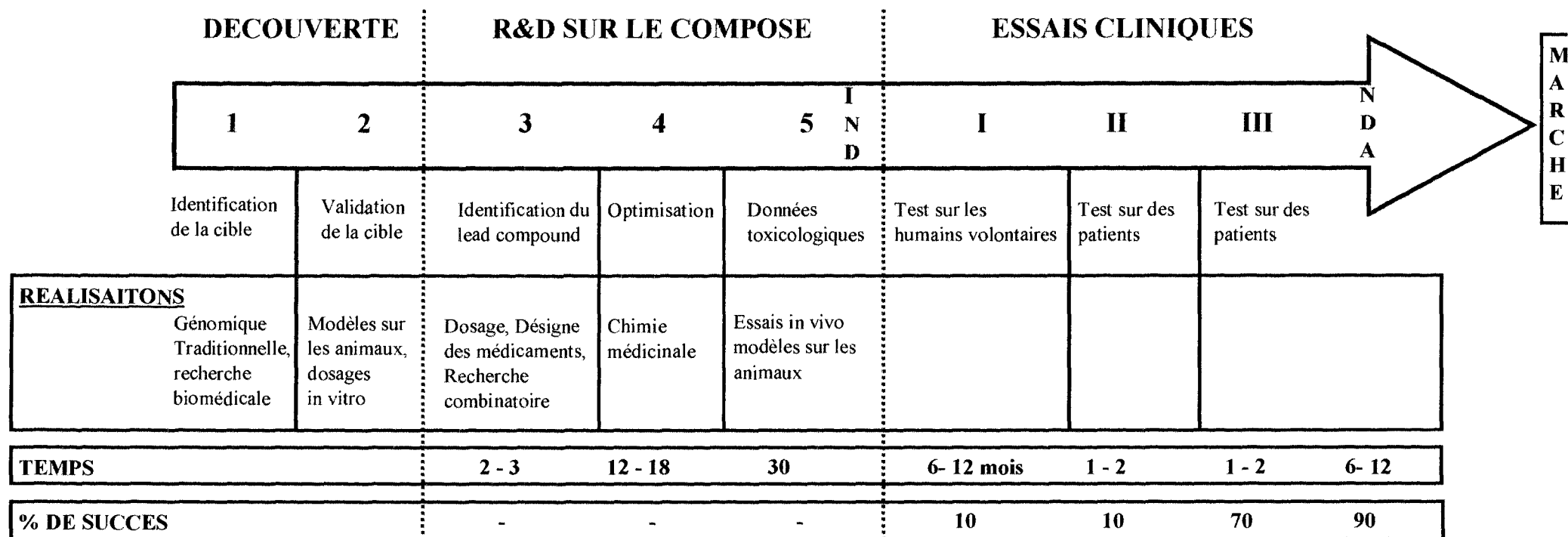


Figure 9 : Chaîne de valeur du médicament, de Sacha Pouget - dans « Apprendre à profiter des opportunités boursières dans le secteur santé »

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

Le développement d'un médicament est un processus long et très coûteux qui est divisé en plusieurs phases. Comme montré sur la figure 9, les trois étapes majeures de la chaîne de valeur sont la découverte du concept, la R&D sur le candidat médicament et les phases d'essais cliniques. L'aspect réglementaire a une importance croissante tout au long de ces trois phases et doit donc être pris en compte dès le début du projet de développement d'une nouvelle thérapeutique.

Les premiers échanges avec les instances réglementaires ont habituellement lieu au niveau des phases 4 et 5 lors de la normalisation du processus de production de l'actif et de son évaluation non-clinique réglementaire. [31]

3.4.2. Textes réglementaires spécifiques des produits issus des biotechnologies

▪ Aspects production

Les principes de base de production sont dans leur majorité assez bien applicable à la production des biomédicaments car il s'agit de textes définissant la mise en place d'une démarche qualité nécessaire à n'importe quel système de production. On se réfère donc aux règles définies par les textes des « Current Good Manufacturing practices » (cGMP) tel qu'énoncé dans EUDRALEX « The rules governing Medicinal Products in the EU, EU guidelines to GMP Medicinal Products for Human and Veterinary Use » pour l'union Européenne ou dans la Food and Drug Administration (FDA) pour les USA. L'ICH (l'International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), reprend et harmonise ces textes dans différents guidelines.

Les recommandations des cGMP sont souvent regroupées sous la forme de dix principes clés:

1. Écrire les modes opératoires et les instructions afin de fournir une "feuille de route" nécessaire à la conformité aux cGMP et à une production de qualité régulière.
2. Suivre scrupuleusement procédures et instructions pour prévenir toute contamination, inversion ou erreur.
3. Renseigner rapidement et précisément le travail en cours dans un but de conformité aux procédures et de traçabilité.
4. Prouver que les systèmes font, ce pour quoi ils sont conçus en effectuant des démarches formelles de validation.
5. Intégrer la productivité, la qualité du produit et la sécurité du personnel dans la conception des bâtiments et des équipements.
6. Effectuer la maintenance des bâtiments et équipements de manière régulière et efficace.
7. Développer et démontrer clairement les compétences au poste de travail.
8. Protéger les produits contre toute contamination en adoptant des habitudes régulières et systématiques de propreté et d'hygiène.

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

9. Construire la qualité dans les produits par un contrôle des matières premières et des processus tels que la fabrication, l'emballage, l'étiquetage...
10. Planifier et effectuer régulièrement des audits afin d'assurer la conformité aux cGMP et l'efficacité du système qualité.

D'autres « guidelines » ont été publiés, reprenant des recommandations spécifiques aux produits biologiques et dérivés des biotechnologies.

Tous ces textes reprennent des recommandations intéressantes à mettre en place le plus tôt possible lors de la définition du processus de production car selon l'étape de développement du candidat-médicament un certain degré de qualité est obligatoire.

Au niveau de la première phase de développement, la phase de découverte (figure 9), le produit ainsi que le système de production sont encore en pleine évolution, il n'y a donc aucune obligation de qualité au niveau réglementaire.

Pour la phase de R&D sur le composé, le processus de production commence à correspondre dans les grandes étapes à celui que l'on retrouvera au niveau industriel. Il n'existe pas de textes déterminant le niveau de qualité requis à cette phase du projet mais au niveau des lots utilisés lors des études non-cliniques réglementaires, les instances attendent un niveau de qualité se rapprochant le plus possible des lots qui seront utilisés lors des phases cliniques. La dernière phase de développement fait l'objet d'une partie spécifique dans les cGMP. La démarche qualité attendue au niveau des lots de phases cliniques reprend exactement tous les grands principes des cGMP mais les processus de fabrication et les procédures de test de la qualité du produit doivent être assez flexibles pour pouvoir évoluer au fur et à mesure du développement du processus de fabrication et de l'amélioration de la connaissance des effets du principe actif. Enfin, avant l'autorisation de mise sur le marché, le système de production du produit doit avoir été certifié conforme aux règles des cGMP.

Le niveau de qualité attendu pour des produits pharmaceutiques synthétisés selon les règles définies par les cGMP est évalué selon différents critères. Les plus importants sont:

- **La reproductibilité** : les lots doivent être produits de façon reproductible dans leur globalité, le principe actif comme les impuretés présentes. Cet aspect doit être validé sur plusieurs productions et la définition des limites d'acceptation doit être validée scientifiquement.
- **Contrôle qualité** : les caractéristiques du produit pharmaceutique doivent être validées les résultats de tests développés et validés selon les règles des cGMP. L'intérêt de ces tests par rapport aux critères évalués devra être confirmé scientifiquement.
- **L'activité** : elle doit être évaluée pour chaque lot produit grâce à des tests définis selon les cGMP et validés scientifiquement.
- **La pureté** : un produit pharmaceutique doit être le plus pur possible mais selon la technique de production utilisée le niveau de pureté peut être différent. La limite

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

d'acceptation du produit doit être définie scientifiquement, les tests utilisés doivent être validés et les impuretés doivent être caractérisées et reproductibles de lot à lot.

▪ Aspects développement de thérapies

La réglementation au niveau du développement du produit pharmaceutique ne commence vraiment à avoir une incidence qu'à partir de la mise en place des études non-cliniques réglementaires. En effet, toutes ces études doivent se dérouler selon les règles des Good Laboratory practice (GLP) ou Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). De même que pour les cGMP, les GLP définissent une démarche qualité selon laquelle doivent se dérouler les études non-cliniques réglementaires et permettent ainsi d'attester de la validité des résultats obtenus au cours de ces études.

Bien que les grands principes d'études non-cliniques et cliniques soient en partie les mêmes, les principes actifs biotechnologiques sont soumis à des textes réglementaires différents des produits synthétiques. En effet, les textes différencient généralement les deux types de produits et des « guidelines » spécifiques ont été publiés (ICH S6, E16). [31]

▪ Dénomination des médicaments biologiques

Comme l'exige la loi dans l'Union Européen, chaque médicament doit porter, soit un nom commercial inventé, soit le nom de la substance active accompagné du nom de la société ou de la marque déposée. La dénomination approuvée, accompagnée du numéro de lot, sont des données importantes pour permettre une identification claire dans le cadre des rapports d'effets indésirables et pour le suivi de l'utilisation sûre du médicament. [11]

3.4.3. Conditions nécessaires à la production d'un biomédicament

Les opérations de production doivent suivre des instructions et des procédures bien définies, elles doivent répondre aux principes de bonnes pratiques de fabrication en vue d'obtenir des produits de la qualité requise et correspondant à leurs autorisations de fabrication et de mise sur le marché.

Des moyens suffisants et adaptés doivent être disponibles pour effectuer les contrôles en cours de fabrication. Des mesures à caractère technique ou organisationnel doivent être prises pour éviter les contaminations croisées et les substitutions. Toute fabrication nouvelle ou modification importante d'un procédé de fabrication doit être validée. Les phases critiques des procédés de fabrication doivent être périodiquement revalidées.

Tous les écarts dans le procédé et tous les défauts observés dans le produit sont documentés et font l'objet d'investigations approfondies.

En effet, une modification du processus de fabrication peut avoir des répercussions importantes sur l'activité biologique et le profil de tolérance du produit final.

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

3.5. Fabrication des biomédicaments

Il est plus complexe de fabriquer des biomédicaments (biomédicaments de référence ou médicaments biosimilaires) que de fabriquer un médicament d'origine chimique (princeps ou générique). Cette complexité accrue tient aux éléments suivants :

- Masse moléculaire élevée
- Structure tridimensionnelle complexe
- Utilisation de systèmes cellulaires vivants
 - Qui sont moins fiables et reproductibles que les méthodes chimiques.
 - Qui peuvent modifier de façon mineure les processus de fabrication et entraîner un changement important des caractéristiques cliniques
- Définition semi-complète de la totalité des propriétés physico-chimiques

❖ Rappel sur la synthèse des protéines

La synthèse d'une protéine à partir de l'information contenue dans l'ADN se déroule en deux étapes :

- la transcription de l'ADN en ARN messager.
- la traduction de l'ARN messager en une protéine.

L'ARN messager

La molécule d'ARN messager est une séquence de bases. Quatre bases différentes sont utilisées dans une molécule d'ARN messager : l'adénine (A), l'uracile (U), la cytosine (C) et la guanine (G).

La première étape de la synthèse des protéines est la transcription du brin codant de l'ADN en ARN messager. Le brin d'ADN transcrit et le brin d'ARN messager créé sont aussi complémentaires. Le schéma ci-dessous illustre la formation de cet ARN messager et le tableau présente les associations (base ADN, base ARN messager) employées pour créer le brin d'ARN.

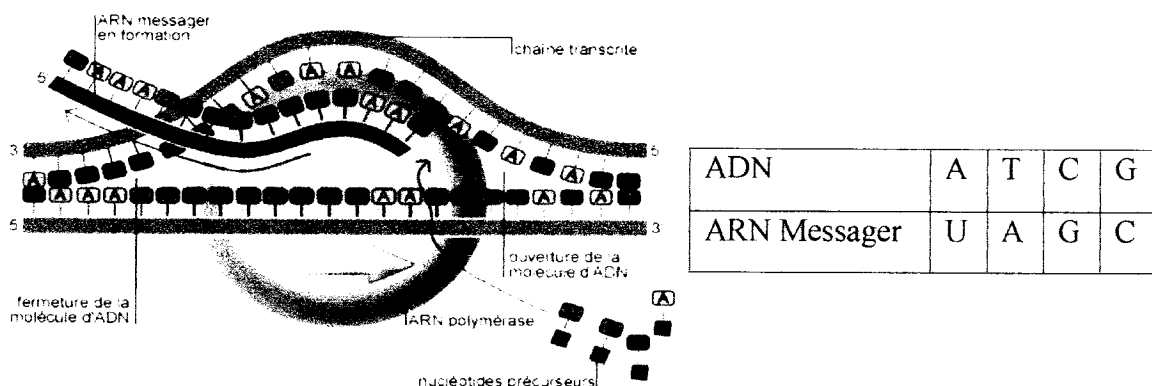


Figure 10 : Processus de transcription de l'ADN

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

Synthèse d'une protéine

La seconde étape de la synthèse d'une protéine est la traduction de l'ARN messenger en une séquence d'acides aminés représentant une protéine. [20]

3.5.1. Technique de formulation

Les biotechnologies permettent d'utiliser des cellules vivantes pour fabriquer des molécules complexes composant les biomédicaments.

Les biomédicaments (ou médicaments biopharmaceutiques) sont des protéines recombinantes (qui est une protéine thérapeutique produite par des cellules recombinantes), nécessite plusieurs étapes obligatoires, depuis la sélection de la séquence d'ADN jusqu'à la formulation finale du produit.

Pour chacune de ces étapes, une implication importante en recherche et développement et en contrôle de la qualité est indispensable. [12]

3.5.2. Étapes nécessaires à la synthèse d'une protéine recombinante

- Identification du gène et choix de la cellule hôte
- Manipulation du plasmide cellulaire
- Culture et multiplication des cellules
- Synthèse de la protéine recombinante
- Purification de la protéine synthétisée
- Formulation du médicament
- Conditionnement pharmaceutique

*** Les propriétés thérapeutiques des protéines recombinantes sont hautement dépendantes du processus de fabrication.**

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

3.5.2.1. Identification du gène et choix de la cellule hôte

- **Choix de la séquence d'ADN**

La première étape de la fabrication d'une protéine recombinante est le choix et l'isolement de la séquence d'ADN correspondant à cette protéine. [37]

- **Choix de la cellule hôte**

Le choix de la cellule hôte où va être transférée la séquence du gène d'intérêt est important.

C'est elle en effet qui va synthétiser la protéine recombinante. Il peut s'agir d'une bactérie, d'une levure ou d'une cellule de mammifère. [8]



Figure 11 : Colonie des bactéries (*Escherichia coli*)

Grâce à sa capacité de croissance rapide et à haute densité, son génome bien caractérisé et sa facilité de culture, la bactérie *Escherichia coli* possède des nombreux avantages qui ont fait d'elle l'un des systèmes hôtes les plus utilisés au monde pour la production de protéines recombinantes. [37]

Les cellules de mammifère (ex : cellules ovariennes de hamster chinois) présentent l'avantage d'assurer un repliement correct de la protéine recombinante ainsi que les modifications post-traductionnelles nécessaires à son activité. [41]

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

3.5.2.2. Manipulation du plasmide cellulaire

- Isolement ou synthèse du segment souhaité d'ADN humain.
- Extraction d'ADN plasmidique dans une cellule sélectionnée et scission de cet ADN par des enzymes.
- Transfert du segment d'ADN humain dans le plasmide cellulaire scindé. Le gène est ensuite inséré dans un plasmide (permettant l'expression de ce gène) par recombinaison, c'est l'étape de clonage.
- Transfert du plasmide manipulé dans une nouvelle cellule exempte de plasmide (cellule hôte) pour permettre sa multiplication. Il en résulte une cellule porteuse du code génétique servant à la synthèse d'une protéine humaine. [29] [37]

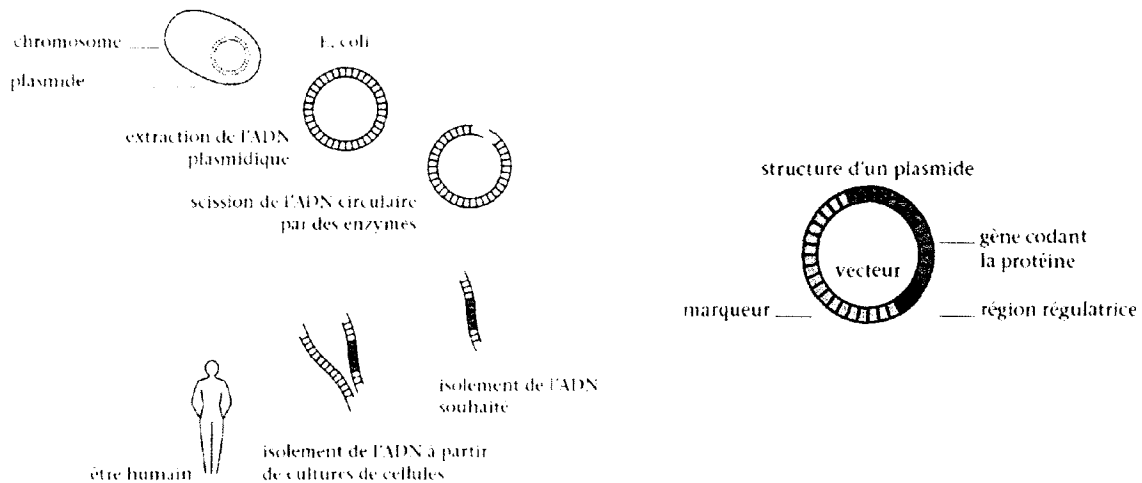


Figure 12 : Résumé de la manipulation du plasmide cellulaire.

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

3.5.2.3. Culture et multiplication des cellules

- **Création d'une banque de cellules**

La cellule qui a reçu le plasmide est dite « transformée », en se multipliant, elle va former une colonie ou « clone » composé de cellules identiques possédant le plasmide recombiné. Un de ces clones sera sélectionné.

Le clone isolé est ensuite préparé en lot de semence, on parle alors de banque de cellules. [37]

- **Culture cellulaire**

La banque de cellules de travail est ensuite transférée dans un bioréacteur où l'apport de substrats comme des extraits de levure et des nutriments va permettre la multiplication cellulaire.

La composition de milieu de culture doit être étroitement formulée et contrôlée, car elle influence de manière importante la production des protéines recombinantes. [40]

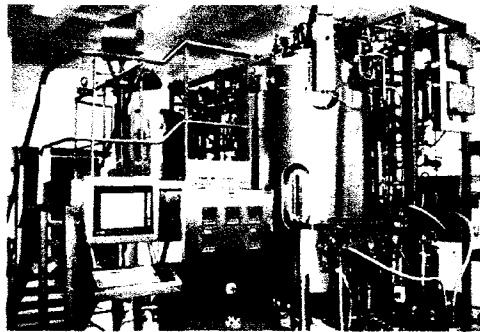


Figure 13 : Un bioréacteur

*** Dans le bioréacteur, les conditions de culture sont optimisées afin de permettre la croissance des cellules.**

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

3.5.2.4. Synthèse de la protéine recombinante

▪ Synthèse protéique

Les cellules vont synthétiser, lors de l'étape de fermentation, la protéine recombinante en quantité importante. [37]

▪ Extraction des protéines

Par choc osmotique, les cellules sont lysées, permettant ainsi la libération des protéines dans le milieu de culture.

Ce choc peut être assisté par un léger traitement avec un détergent (ce qui permet aussi d'aider à maintenir les protéines en solution). Une certaine action mécanique peut aussi être ajoutée au processus, un homogénéisateur à piston permet de briser la plupart des cellules de mammifères. [37]

Dans tous les cas, une méthode brutale peut aussi être utilisée. Le traitement aux ultrasons, une lyse mécanique utilisant des billes de verre ou une presse Aminco-French, comme les cycles de congélation/décongélation, sont tous des moyens envisageables.

L'extraction s'effectuera dans une solution tampon, dans laquelle les cellules seront resuspendues après une centrifugation visant à les concentrer. À cette étape, la protéine est fort probablement en concentration infime par rapport à toutes les autres protéines cellulaires, nous mettrons les chances de notre côté en limitant toute dilution supplémentaire.

On cherchera autant que possible à maintenir une concentration élevée dès les premières étapes. [40]

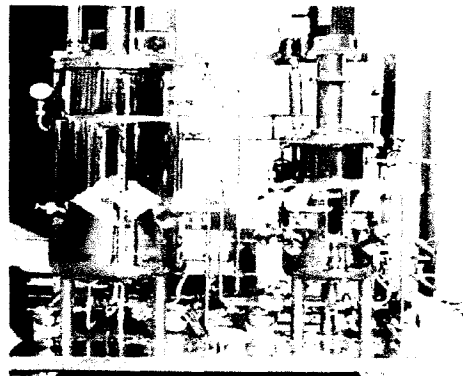


Figure 14 : Appareil d'extraction des protéines

*** Le produit doit ensuite subir de tests d'efficacité, de tolérance et de toxicité, (tests réalisés sur les cultures de cellules ou chez l'animal).**

Il est ensuite nécessaire de purifier ces protéines en plusieurs étapes afin d'obtenir une qualité optimale.

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

3.5.2.5. Purification de la protéine synthétisée

- **Filtration et Centrifugation**

Les protéines extraites sont ensuite filtrées et centrifugées pour éliminer les débris cellulaires et les particules indésirables afin de concentrer la protéine. [30]

- **Purification**

Plusieurs étapes de purification sont nécessaires afin d'obtenir un produit à la pureté optimale.

Une des techniques les plus couramment utilisées est la purification par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). [40]

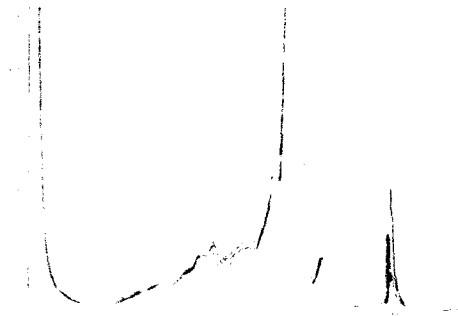


Figure 15 : Pic chromatographique

*** A l'issue des étapes de purification, on obtient une protéine à la pureté optimale qui doit entrer en phase de formulation.**

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

3.5.2.6. Formulation du médicament

L'étape de formulation est critique pour la stabilité de la protéine, c'est-à-dire le maintien de sa structure (en particulier l'évitement de la formation d'agrégats) et de son activité biologique.

Au cours de cette étape, la protéine est analysée en termes de structure, d'activité biologique et de profil d'impuretés. [12]

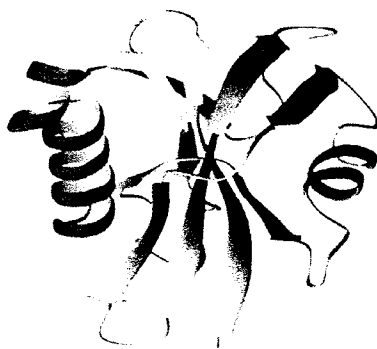


Figure 16 : Structure d'un médicament biologique

Le produit acquiert ensuite sa forme galénique optimale, qui est fonction des propriétés de la protéine, des objectifs thérapeutiques, de la technologie disponible et des facteurs économiques. [36]

*** Après l'étape de formulation, le produit possède sa composition et sa concentration finales. Le produit doit ensuite être conditionné avant sa mise à disposition pour le patient.**

3.5.2.7. Conditionnement pharmaceutique

Les protéines recombinantes sont particulièrement sensibles à leur environnement. Elles exigent en conséquence un conditionnement adapté.

Le conditionnement garantit en première instance la stabilité et l'intégrité du médicament.

Il est également un support d'information important pour le patient et les professionnels de santé.

De par sa facilité d'emploi et sa lisibilité, il est un facteur favorisant l'observance. [35]

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

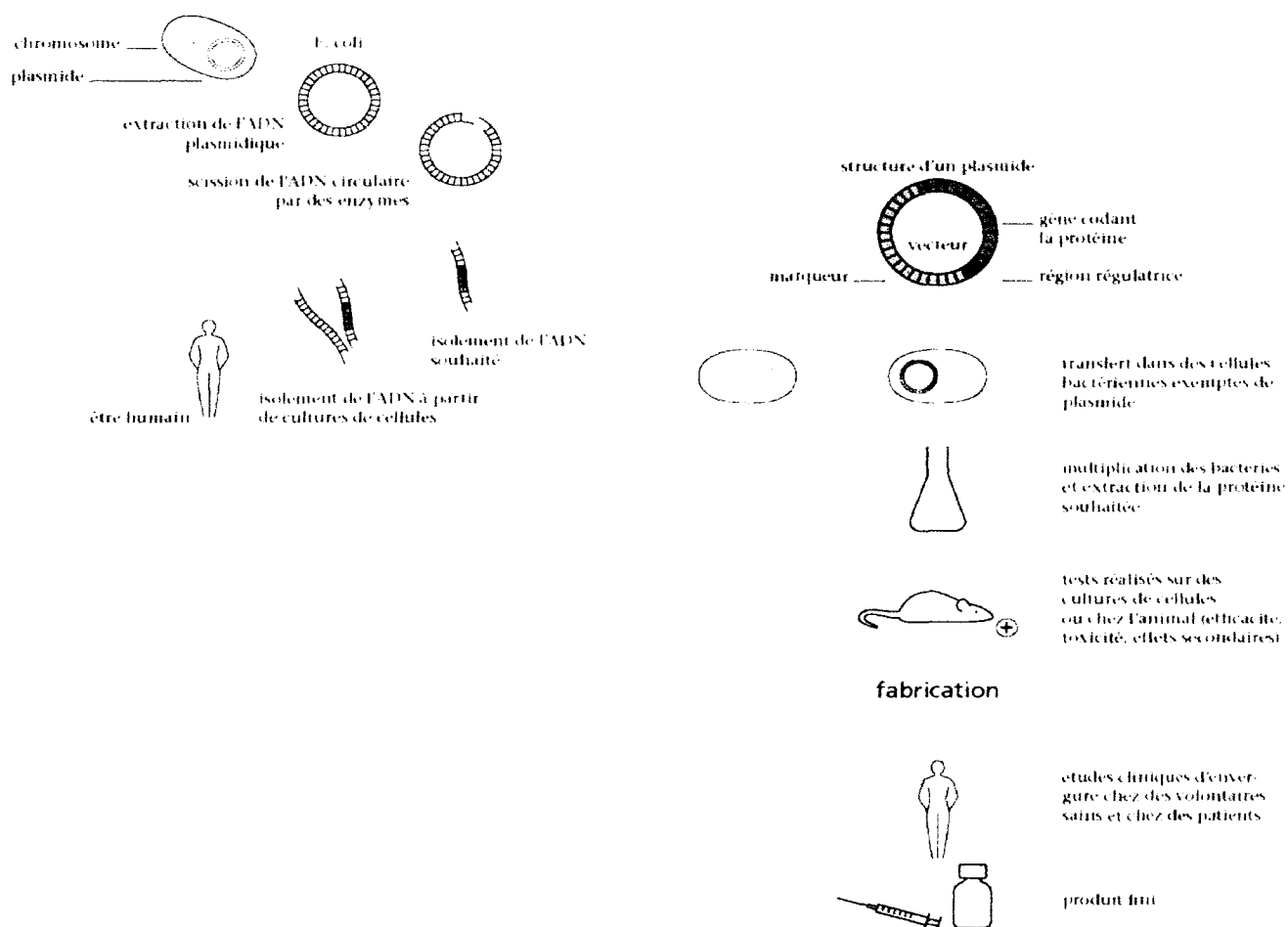


Figure 17 : Résumé du processus de fabrication des biomédicaments

3.5.2.8. Contrôle qualité des protéines recombinantes (biomédicaments)

La grande complexité des biomolécules nous mène à des exigences particulières quant à leur assurance qualité. Dans la plupart des cas une combinaison de différentes techniques analytiques s'avère nécessaire pour la caractérisation et le contrôle qualité des protéines à usage pharmaceutique.

L'identité, la pureté, l'activité et la stabilité du produit fini sont établies initialement par réalisation d'un nombre important d'essais chimiques, physiques, immunochimiques et biologiques.

Les essais réalisés pendant le processus de fabrication de la matière première

▪ Contrôle des cellules

L'origine, la forme, la conservation, l'utilisation et la stabilité aux taux d'utilisation prévu doivent être attestées pour toutes les banques cellulaires (banque cellulaire primaire et banque cellulaire de travail) dans les conditions de conservation.

Toutes nouvelles banques des cellules doivent être totalement validées.

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

▪ Analyse par hybridation

L'ADN de l'échantillon à examiner est immobilisé sur une membrane de nitrocellulose, dénaturé pour donner un ADN simple brin et hybridé avec de l'ADN marqué (sondes) préparé à partir de système hôte-vecteur utilisé en fabrication.

▪ Analyse partielle de la séquence des acides aminés

Réalisée afin de confirmer que les segments N-terminaux et C-terminaux ont été correctement fabriqués.

▪ Cartographie des peptides

Elle se fait par segmentation chimique ou enzymatique du produit protéique, suivie d'une analyse par une méthode appropriée telle que l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel, électrophorèse capillaire ou la chromatographie en phase liquide.

Elle démontre l'absence différences significatives entre la protéine à examiner et la préparation de référence, peut être utile pour démontrer que les ponts disulfures sont corrects.

▪ Détermination de la pureté chimique

La pureté de la protéine recombinante est analysée avec une préparation de référence par une méthode appropriée telle que la chromatographie en phase liquide, l'électrophorèse en phase liquide, l'électrophorèse capillaire ou l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou dodécylsulfate de sodium.

▪ Détection de protéines issues de la cellule hôte

Par méthodes immunochimiques (par exemple : westernblot).

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

Les essais réalisés sur le produit fini

▪ Caractéristiques physico chimiques du produit fini

Tableau 3: Caractéristiques physico chimiques du produit fini

Essai	Spécifications	Méthode
<u>Aspect du produit fini :</u>		
Identification de l'ampoule.	Ampoule en verre non coloré, transparente d'une capacité variable selon le produit.	Visuelle
Aspect de la substance lyophilisée.	Blanche lyophilisée.	Visuelle
<u>Caractéristiques physico-chimiques</u>		
Temps de reconstitution de la substance lyophilisée.	Moins de 60 secondes dans 1 ml d'eau PPI.	Visuelle
Clarté et degré d'opalescence.	Pas plus que la suspension témoin II (PE) lors de sa reconstitution dans l'eau PPI.	Visuelle
Contamination particulière après reconstitution.	Libre de toute particule visible lors de sa reconstitution dans le liquide pour son injection.	Visuelle
Degré de coloration de la solution.	Pas plus que la solution témoin.	PE
pH de la solution.	6,5 - 7,5	Potentiométrie
Poids du contenu et du contenant.	29 - 35 mg	Pesée
Uniformité de masse.	Moins de 2 unités présentent une déviation de plus de 10% par rapport à la moyenne. Aucune unité ne présente une déviation de plus de 20%.	PE

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

▪ Tests d'identité

Les tests d'identité comprennent de façon générale des techniques permettant de vérifier la taille de la molécule, sa séquence primaire, son profil isoélectrique, ses propriétés chromatographiques et l'adoption par la molécule de la configuration fonctionnelle correcte.

Ils sont divisés en 2 tests principaux :

- Détermination du poids moléculaire
- Analyse quantitative de la composition en acides aminés

✓ Détermination de poids moléculaire

Pour la détermination du poids moléculaire, l'électrophorèse *SDS-PAGE* (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) est une méthode appropriée, facile et rapide, très utilisée en tests de routine pour le contrôle qualité.

✓ Analyse quantitative de la composition en acides aminés

L'analyse de la séquence d'acides aminés nous éclaire sur la structure primaire de la protéine et peut être réalisée pour la caractérisation dans le cadre du contrôle qualité, malgré sa grande valeur d'information pour l'identification d'une séquence correcte cette méthode est peu utilisée dans les tests de routine car elle nécessite un équipement onéreux (HPLC après hydrolyse complète)

▪ Tests de pureté

Les méthodes analytiques applicables aux protéines sont habituellement développés sur la base de la taille, la charge et du caractère hydrophobe, par exemple : chromatographie liquide en phase d'exclusion, chromatographie liquide échangeuse d'ions, chromatographie liquide en phase inversée, SDS-PAGE, focalisation isoélectrique, électrophorèse capillaire.

✓ Structure de la protéine

La mesure spectrophotométrique de l'absorption sur des longueurs d'ondes caractéristiques est utilisée pour la détermination facile et rapide de la pureté.

La chromatographie d'exclusion HPLC-SEC est utilisée pour contrôler l'absence de fragments et d'agrégats.

✓ Détermination de la Charge

2 méthodes sont proposées :

- La méthode de concentration isoélectrique (IEF), où les protéines migrent en fonction de leur charge totale, dans un gel à gradient de pH par application d'un champ électrique, est un moyen utile pour séparer et estimer les classes d'isoformes chargées différemment d'une protéine. La survenue de micro-hétérogénéité suite aux

Biomédicaments : Fabrication, contrôle qualité et aspects réglementaires

modifications post-transcriptionnelles lors de la glycosylation ou la phosphorylation peut également être détectée.

- L'électrophorèse capillaire est une autre technique de séparation relativement récente pour les molécules chargées et les carbohydrates qui suscitent d'avantage d'intérêts par rapport à son temps d'analyse rapide et ses possibilités d'automatisation.

✓ Analyse de la chaîne osidique

Beaucoup des méthodes analytiques peuvent être utilisées pour caractériser les structures carbohydrates des glycoprotéines. Certaines sont plus communes pour l'analyse structurale, d'autres sont spécifiques pour l'identification des carbohydrates.

✓ Les impuretés

Des techniques immunologiques comme l'ELISA sont utilisées pour tester les faibles niveaux de protéines contaminants pouvant être originaire de la cellule hôte recombinante ou d'autres organismes immunogéniques.

▪ Tests de sécurité

✓ *In vivo* : test des pyrogènes

C'est la recherche des structures des substances pyrogènes dans les produits pharmaceutiques à usage parentéral, la technique *in vivo* chez le lapin, pour limiter à un niveau acceptable le risque de réaction de fièvre chez les patients.

✓ *In vitro* : LAL test (Limulus Amébocyte Lysat)

Le test LAL est utilisé pour la détection *in vitro* des endotoxines par méthode de gélification dans les préparations des biomédicaments.

La Pharmacopée européenne fixe des normes surtout pour les préparations urinaires.

▪ Test de stérilité

Démontré par le test de filtration sur membrane, selon la pharmacopée européenne, l'absence de contamination microbienne des produits déclarés stériles.

▪ Test d'activité

Les essais immunochimiques : comme le RIA (essai radio-immunologique) et ELISA, permettent la détermination quantitative de la teneur en protéines qui possèdent une conformation correcte car les anticorps utilisés dans les essais reconnaissent uniquement ces protéines avec une structure tertiaire correcte. Mais les fragments biologiquement inactifs ou les agrégats peuvent eux aussi être détectés dans ces essais. Pour cette raison une protéine recombinante doit faire l'objet d'essais biologiques d'activité *in vivo* ou *in vitro*.

4. EXEMPLES DE BIOMEDICAMENTS

Exemples de biomédicaments

▪ Les insulines humaines

Toutes les insulines commercialisées actuellement sont des insulines dites «humaines» ou des « analogues de l'insuline humaine » obtenues par biotechnologies.

▪ Les facteurs de coagulation

- Facteur II

C'est un facteur de coagulation, vitamine K-dépendant, appartenant aux facteurs du complexe prothrombinique : II, V, VII, X.

Synonyme : Prothrombine.

- Facteur VIII

Le facteur VIII circule dans le plasma sous forme liée au facteur Willebrand qui le protège d'une dégradation protéolytique rapide.

Synonyme : facteur anti-hémophilique A.

▪ Les facteurs de croissance cellulaire

- G-CSF

C'est le facteur de croissance le plus utilisé et un des premiers identifié.

- Érythropoïétine (EPO)

L'Erythropoïétine induit l'érythropoïèse en stimulant la division et la différenciation des progéniteurs des cellules érythroïdes et stimule aussi la libération des réticulocytes à partir de la moelle vers le flux sanguin.

- Thrombopoïétine

Principal facteur de croissance stimulant la production de plaquettes.

▪ Les anticorps monoclonaux (rituximab, tocilizumab, adalimumab, basiliximab)

Les anticorps monoclonaux sont très largement utilisés en biologie et en médecine, à la fois comme outils de diagnostic et dans des buts thérapeutiques.

▪ Les immunomodulateurs (étanercept, abatacept, anakinra)

On peut parler d'immunomodulation ou d'immunosuppression en fonction de la puissance de leurs actions sur le système.

Développés initialement pour le traitement des pathologies tumorales, mais leurs effets immunomodulateurs font également des traitements de choix dans les maladies inflammatoires.

▪ Les vaccins :

- contre le tétanos
- contre la grippe
- vaccin de l'hépatite B (qui fait l'objet de l'étude pratique de ce mémoire).

Exemples de biomédicaments

4.1. Vaccin de l'hépatite B rADN

Le premier vaccin contre l'hépatite B a été mis au point en 1976. Ce vaccin d'origine plasmatisque a été progressivement remplacé par les vaccins issus du génie génétique mis sur le marché à la fin des années 1980.

Dans plusieurs pays, y compris l'Algérie le vaccin contre l'hépatite B est intégré au calendrier vaccinal.

4.2 Production du vaccin de l'hépatite B rADN

De nos jours, le vaccin contre l'hépatite B est fabriqué par génie génétique. Un bout d'ADN (le gène) qui contient l'information nécessaire à l'élaboration d'une protéine de surface du virus (l'Ag HBs) est copié, isolé et inséré dans un plasmide d'expression puis ce plasmide recombinant est introduit dans des cellules. Les lignées cellulaires utilisées lors de la fabrication du vaccin hépatite B rADN sont des cellules de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Durant l'étape suivante, des cellules de levure vont prendre en charge la production de la protéine virale. Celle-ci sera ensuite purifiée et appliquée en tant que vaccin.

Ce vaccin est absorbé sur de l'hydroxyde d'aluminium et contiennent aussi du thiomersal (un dérivé du mercure).

Ce mode de fabrication est pourvu d'avantages divers : son prix économique et le fait que les vaccins ne puissent être contaminés par des virus vivants.

NB : Pour assurer la stabilité du vaccin, il faut respecter la chaîne du froid (+2°- +8°C) pour garder leur efficacité depuis sa date de fabrication jusqu'à la date d'expiration du vaccin.

Exemples de biomédicaments



Couper un brin d'ADN du patrimoine génétique du virus de l'hépatite B lequel contient le plan d'élaboration d'une protéine déterminée.

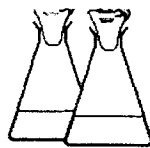


Cette protéine, dénommée antigène (Ag HBs) déclenche sur l'individu une réaction immunitaire contre le virus.

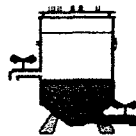
Le brin d'ADN sera introduit dans un plasmide (anneau d'ADN) de la levure, *Saccharomyces cerevisiae*.



Les cellules de levure prennent en charge la production de l'antigène.



Cultures



Récolte



Purification



Antigène purifié



Application de l'antigène purifié en tant que vaccin

Figure 18 : Procédé de fabrication du vaccin Hépatite B rADN

Exemples de biomédicaments

4.3. Nécessité du contrôle du vaccin hépatite B rADN

Les médicaments issus de la biotechnologie (biomédicaments) sont des médicaments particuliers car fabriqués à partir d'organismes vivants. Les précautions de fabrication sont particulièrement délicates. La production s'effectue dans un environnement stérile pour éviter toute contamination. Les contrôles s'effectuent tout au long du processus de fabrication pour assurer la qualité, la pureté et la sécurité du produit final.

L'appellation «vaccin Hépatite B» ne prouve pas l'innocuité et l'activité du vaccin si celui-ci n'a pas été contrôlé. Le contrôle de la qualité des vaccins hépatite B est d'une importance primordiale pour tout programme de lutte contre l'hépatite B. On ne doit jamais utiliser des vaccins non contrôlés, car une fausse présomption d'immunité chez l'animal peut avoir des conséquences lourdes.

La qualité des vaccins hépatite B rADN doit être contrôlée à deux niveaux : par le fabricant, mais aussi par un organisme officiel de contrôle, du pays où il est produit.

Le produit est également contrôlé par le laboratoire de contrôle officiel du pays importateur, en Algérie c'est l'Institut Pasteur d'Algérie (**IPA**).

La qualité du vaccin hépatite B est confirmée par les nombreux essais menés au cours du processus de fabrication.

À l'**IPA** la qualité des produits biologiques (vaccins et immunosérums) est assurée par le laboratoire de contrôle de la qualité formé de 5 unités :

- Unité physico-chimie
- Unité pharmaco-toxicologie
- Unité microbiologie
- Unité immunochimie
- Unité culture cellulaire

PARTIE PRATIQUE

1. OBJECTIF DU TRAVAIL

Objectif du travail

Nous nous sommes intéressé dans ce mémoire au suivie des étapes de contrôle de qualité du vaccin hépatite B rADN adulte, flacon unidose de 1ml, un médicament issu de la biotechnologie contenant comme principe actif un antigène de surface (AgHBs) de virus hépatite B.

En effet, ce vaccin n'est pas encore produit par l'Institut Pasteur d'Algérie et est importé des laboratoires des pays producteurs d'où la nécessité systématique du contrôle de la qualité.

Notre stage pratique s'est déroulé au sein de l'Institut Pasteur d'Algérie où on a procédé au contrôle qualité du vaccin hépatite B rADN, faisant l'objet d'essai physico-chimique, microbiologique, pharmaco-toxicologique et immunologique.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériels et méthodes

2.1 Matériels

2.1.1 Matériels biologiques

- Les milieux de culture (TSB et TG)
- Kit Monolisa™ HBs Ag ULTRA
- Souris de 17 g à 22 g souche NMRI suis
- Cobayes de 250 g à 400 g

2.1.2 Réactifs chimiques

❖ Réactifs utilisées dans l'Unité physico-chimie

▪ Réactifs du pH-mètre

- Eau déminéralisée ou distillée

Solutions étalons pour l'étalonnage d'un pH-mètre :

- Solution tampon pH : 4.00 à 20 °C
- Solution tampon pH : 7.00 à 20 °C
- Solution tampon pH : 10,00 à 20 °C
- Chlorure de potassium (KCl)
- Réactifs pour le dosage d'Aluminium (Al^{3+})
 - Solution d'acide nitrique HNO_3 (concentré)
 - Solution d'acide sulfurique H_2SO_4 (concentré)
 - Méthyl orange
 - Acétate tampon
 - Solution d'EDTA
 - Pyridylazonaphtol
 - Solution de sulfate de cuivre
- Réactifs pour le dosage de thiomersal
 - Thiomersal
 - Diphénylthiocarbazone (Dithizone)
 - Solution d'acide nitrique HNO_3 concentrée
 - Acétate d'ammonium $C_2H_3O_2NH_4$
 - Chloroforme $CHCl_3$
 - Acide chlorhydrique HCl

Matériels et méthodes

❖ Réactifs utilisées dans l'Unité Pharmaco-toxicologie

- **Réactifs pour le test de la toxicité anormal**
- Alcool iodé (désinfection du point d'inoculation)
- Fuchsine (colorant)
- Violet de gentiane (colorant)

❖ Réactifs utilisées dans l'unité Immunochimie

▪ Réactifs pour de kit HBs

Réactifs prêts à l'emploi :

- Réactif 1 (R1) : Microplaque
- Réactif 3 (R3) : Contrôle Négatif
- Réactif 4 (R4) : Contrôle Positif
- Réactif 10 (R10) : Solution d'arrêt

Réactifs à reconstituer :

- Solution de lavage (concentrée 20X) : Réactif 2 (R2)
- Conjugué (R6 + R7)
- Solution de révélation enzymatique (R8 + R9)

❖ Réactifs de nettoyage

- Alcool à 70°
- Hypochloride de sodium (Eau de javel) et bicarbonate de soude

2.1.3 Appareillage

- Hotte chimique (Derpa)
- pH mètre (ScichemTech Mettler Toledo)
- Plaque chauffante
- Appareil de filtration sur membrane.
- Agitateur d'ampoules à décantation (Agitelec)
- Spectrophotomètre UV/Visible (Pharmacia Biotech Ultrascope 3000)
- Dispositif d'agitation : agitateur (VELP Scientifica) et barreaux magnétiques
- Minéralisateur (Gerhardt Kjeldatherme)
- Étuves d'incubation (25°C, 35°C)
- Appareil de lecture pour microplaques équipés de filtres 450, 490 et 620-700 nm.
- Système de lavage, automatique, semi-automatique ou manuel pour microplaque.
- Chauffe ballon électrique

Matériels et méthodes

- Balance

2.1.4 Verrerie

- Tubes à essais
- Bécher
- Erlenmeyer
- Verre à pied
- Éprouvette graduée (10 ml - 1000 ml)
- Burette graduée
- Pipette graduée
- Pipette jaugée
- Fiole jaugée
- Agitateur en verre
- Ballon à fond rond
- Ampoule à décanter
- Réfrigérant droit (ou colonne à distiller)
- Entonnoir
- Verre de montre
- Fiole à vide
- Tête de colonne

2.1.5 Consommable

- Seringues (1 ml, 5 ml ,10 ml)
- Propipette
- Pipeteur
- Entonnoir Büchner
- Trompe à eau
- Pissette
- Compte-gouttes
- Pince en bois
- Support élévateur
- Valet
- Agitateur magnétique
- Potence
- Noix
- Pince
- Spatule
- Bouchon
- Matras
- Conteneur de déchets contaminés

Matériels et méthodes

- Papier Joseph
- Papier absorbant

2.2 Méthodes

Les méthodes utilisées pour le contrôle du vaccin Hépatite B rADN flacon adulte 1 ml sont décrites dans des procédures qui ont été validées au laboratoire et approuvées par le directeur de contrôle qualité de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Par ailleurs, nous avons procédé à des tests physico-chimiques (Spectrophotométriques, complexométriques), tests microbiologiques (d'ensemencement direct et filtration sur membrane), tests pharmaco-toxicologiques (de toxicité anormale) et tests immuno-chimiques (enzymatique).

2.2.1 Essais physico-chimiques

▪ Contrôle de la limpidité et du degré d'opalescence du vaccin

La limpidité est le premier critère d'appréciation de la qualité du vaccin, la limpidité d'un vaccin est toujours synonyme d'un produit de qualité par rapport à un vaccin trouble mais il existe toujours les exceptions.

La limpidité s'apprécie par observation sous un éclairage indirect faible après agitation légère et se quantifie par mesure de la turbidité.

▪ Contrôle du volume extractible des préparations parentérales

Principe

Le contrôle est basé sur la détermination du volume extractible par mesure du volume liquide contenu dans les récipients des préparations parentérales.

Mode opératoire pour les récipients unidose

Le nombre des échantillons à analyser doit être choisi selon leur volume nominal :

- Si le nombre des échantillons contient un volume inférieur ou égal ($\leq$) à 5 ml, 5 récipients (ampoules)
- Si le nombre des échantillons contient un volume supérieur ou égal ($\geq$) à 5 ml, 3 récipients (ampoules)
- Si le nombre des échantillons contient un volume supérieur ou égal ($\geq$) à 10 ml, 1 récipient (ampoule)

Ensuite prélever dans sa totalité le contenu de chaque récipient à l'aide d'une seringue sèche d'une capacité n'excédant pas 3 fois le volume à mesurer et munie d'une aiguille de 21 gauges d'une longueur d'au minimum 2,5 cm.

Matériels et méthodes

Dans le cas des récipients de volume nominal inférieur ou égale à 2 ml, le contenu d'un nombre suffisant de récipients peut être mélangé afin d'obtenir le volume requis pour la mesure à condition d'utiliser une seringue montée sèche différente pour chaque récipient.

Dans le cas des récipients de volume nominal supérieur ou égal à 10 ml le volume peut être déterminé en le vidant directement dans l'éprouvette graduée.

▪ Contrôle de pH

Le contrôle de pH se fait par le pH mètre

Principe général

La différence de potentiel existant entre une électrode de verre et une électrode de référence plongeant dans une même solution, est une fonction linéaire du pH de celle-ci.

La détermination du pH revient donc à la mesure exacte d'une différence de potentiel. Cette mesure s'effectue à l'aide d'un dispositif potentiométrique à amplificateurs. Ce montage est nécessaire par suite de la grande résistance du circuit électrique et, en particulier, de l'électrode de verre.

Etant donné l'influence de la température sur le résultat de la mesure, l'électromètre employé devra être muni d'un dispositif permettant la compensation de la température et la conversion exacte de la force électromotrice en unités de pH, à la température de l'échantillon.

Mode opératoire

Étalonnage du pH mètre

Deux solutions étalons sont nécessaires pour étalonner le pH-mètre. Leurs pH doivent si possible, être situés de part et d'autre de la valeur du pH présumée de la solution d'essai.

Réglage du zéro du pH mètre

Rincer les électrodes avec la première solution tampon étalon en faisant couler le liquide le long de celles-ci.

Introduire un volume suffisant de la même solution étalon dans le récipient de mesure, propre et sec, et y plonger les électrodes.

Régler l'indication du pH-mètre sur la valeur du pH de la solution étalon en tenant compte de la température de celle-ci.

Retirer les électrodes et jeter la solution étalon contenue dans le récipient de mesure.

Réglage de la pente du pH mètre

Rincer les électrodes avec de l'eau déminéralisée ou distillée puis avec la deuxième solution tampon étalon.

Introduire un volume suffisant de la même solution-tampon étalon et y plonger les électrodes.

Matériels et méthodes

Si le résultat obtenu correspond à la valeur connue du pH de la solution étalon, l'appareil est en état de marche et est convenablement étalonné.

Contrôle de l'étalonnage

Utiliser une solution-tampon d'une valeur de pH intermédiaire à celles utilisées pour l'étalonnage.

Mesures du pH

Une fois que l'appareil a été étalonné, laver les électrodes et le récipient de mesure, d'abord à l'eau déminéralisée ou distillée, sécher l'électrode à l'aide de papier Joseph, puis avec la solution d'essai en opérant comme précédemment. Homogénéiser la solution d'essai, en introduisant un volume suffisant dans le récipient de mesure et y plonger les électrodes.

Agiter légèrement la solution d'essai.

La lecture

La lecture du pH du vaccin se fait directement à partir du pH-mètre après avoir vérifiée que l'indication donnée est stable pour éviter des éventuelles erreurs de résultats.

▪ Dosage de l'aluminium

L'aluminium est un adjuvant utilisé pour stimuler la réponse immunitaire et accroître le niveau d'anticorps circulants, son dosage a pour but de confirmer que le taux présent dans le vaccin ne dépasse pas le seuil fixé par les autorités sanitaires.

Principe

La recherche de la teneur en aluminium est quantifiée par une méthode complexométrique. L'aluminium est sous la forme d'hydroxyde d'aluminium ou phosphate d'aluminium. Le composé est tout d'abord minéralisé afin d'obtenir de l'aluminium libre, puis complexé avec de l'EDTA en présence d'un tampon adapté.

L'EDTA non complexé (en excès) est alors dosé en retour à l'aide d'une solution titrée de sulfate de cuivre en présence de pyridylazonaphtol.

Mode opératoire

Le dosage d'aluminium se fait en double essai.

La première étape

Prélever 2 ml des échantillons (PE) à analyser et déposer au niveau de matras de 50 ml puis sur hotte ajouter 1 ml de $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{conc})}$ + quelques gouttes de HNO_3 (7 gouttes).

Ensuite placer les matras sur la rampe de minéralisation, jusqu'à obtention d'un précipité transparent et laisser refroidir et ajouter 10 ml d'eau distillée, une solution opalescente est obtenu qui est ensuite minéralisé jusqu'à ébullition (environs 5 minutes).

Matériels et méthodes

La deuxième étape

Après la minéralisation faire le traitement du minéralisât.

- Le premier traitement : la neutralisation

Ajouter 0,05 ml de méthyl orange puis neutraliser avec la solution concentrée de NaOH quelques gouttes jusqu'à virage au jaune. Faire revenir à l'acidité par addition de quelques gouttes d'H₂SO₄ 1M jusqu'au virage au rose, transvaser le contenu du matras vers un erlenmeyer puis laver le matras avec 10 ml de l'eau distillée.

- Le deuxième traitement : réaction de complexation

Ajouter 10 ml de l'EDTA + 10 ml d'acétate tampon, un changement de l'aspect vers une couleur jaune orangée est observée. Passer au chauffage sur la plaque chauffante jusqu'à ébullition pendant exactement 3 minutes.

Ajouter 0,1 ml (quelques gouttes) de pyridylazonaphtol comme indicateur coloré et faire un titrage direct par la solution de CuSO₄ jusqu'à virage à la violette betterave et noter la chute de burette.

Pour le volume témoin procéder de la même manière sauf la minéralisation (absence d'aluminium) ce dosage est appelé dosage à froid.

Lecture-Calcul

La lecture : noter la chute de la burette

Le calcul : se fait par application de la formule suivant :

$$\text{Teneur en aluminium (mg/ml)} = \frac{(V_t - V_x) \times 0,5396}{V_e}$$

Où : V_t : volume témoin

V_x : volume de la chute de burette

0,5396 : constante

V_e : prise d'essai

▪ Dosage du thiomersal dans les vaccins

Le thiomersal est un agent conservateur renfermant de l'éthyle mercure utilisé pour prévenir toute prolifération bactérienne ou fongique, son dosage a pour but de vérifier s'il est à l'état de trace car il est employé comme conservateur au cours du processus de fabrication mais n'a pas été ajouté au produit final.

Le dosage du thiomersal dans les vaccins est quantifié par la méthode spectrophotométrique.

Matériels et méthodes

Principe

Le thiomersal réagit avec la dithizone en présence de chloroforme et forme un complexe de couleur orange. Le complexe formé et l'excès de dithizone sont extraits à l'aide de chloroforme. L'absorbance du standard et de l'échantillon est mesurée après extraction et la quantité de thiomersal est calculée.

Mode opératoire

La manipulation se fait en plusieurs étapes et en double essai.

✓ La préparation des ampoules à décanter pour l'extraction

Laver les ampoules à décantations avec l'acide nitrique concentré et rincer à l'eau de robinet puis à l'eau distillée, et laisser sécher.

✓ Préparation de la gamme étalon du thiomersal

D'abord, préparer de la gamme étalon à partir de la solution mère de thiomersal 0,01%.

La gamme étalon est composée de concentrations suivantes :

- C (1) : 0,02 mg (volume prélevée de la solution mère = 0,2 ml)
- C (2) : 0,05 mg (volume prélevée de la solution mère = 0,5 ml)
- C (3) : 0,07 mg (volume prélevée de la solution mère = 0,7 ml)
- C (4) : 0,09 mg (volume prélevée de la solution mère = 0,9 ml)

Compléter chaque concentration jusqu'à 10 ml avec la solution de tampon acétate.

✓ Étape d'extraction du thiomersal des échantillons à analyser

Réaliser l'extraction du thiomersal dans les ampoules à décanter lavées et séchées, ensuite déposer 0,5 ml de la prise d'essai et compléter chaque échantillon jusqu'à 10 ml avec du tampon acétate.

Ensuite faire la régénération de dithizone et déposer dans toutes les ampoules 10 ml et une séparation de phases est observée, le dithizone qui est dans la phase 2 fixe le thiomersal et une coloration verte olive est observée. Le volume final obtenu est de 20 ml.

✓ Étape d'extraction proprement dite

Fixer les ampoules sur l'agitateur d'ampoules à décantation et lancer l'agitateur pendant 45 secondes, une dégradation de la couleur verte foncée vers le vert moins foncée est observée.

✓ La lecture au spectrophotomètre UV/Visible

Calibrer le spectrophotomètre à 485 nm puis placer le blanc avec la solution de dithizone diluée au $1/10^{\text{ème}}$. Utiliser la gamme étalon pour la détermination du facteur F de la courbe d'étalonnage.

Refaire la procédure en utilisant les échantillons.

Matériels et méthodes

Lecture - Calculs

La lecture des absorbances des échantillons se fait directement sur le spectrophotomètre. La concentration en thiomersal du produit est calculé par application la formule suivant :

$$C_x = A_x \times F \text{ (mg/0,5 ml)}$$

Où C_x : Concentration en thiomersal du produit

A_x : Absorbance du produit

F: Facteur de la courbe d'étalonnage

2.2.2. Essais microbiologiques

Contrôle de la stérilité bactérienne et fongique

La stérilité est une méthode qui prouve que le vaccin ainsi que toutes les autres produits sont exempts de germes, microorganismes, et que le produit est stérile.

Milieux de culture

Pour effectuer le test de la stérilité, utiliser deux milieux de culture :

- ✓ Le milieu TSB ("bouillon trypticase soja" pour l'isolement des bactéries)
- ✓ Le milieu TG ("milieu au thioglycolate" pour l'isolement des levures et champignons)

Mode opératoire

Techniques et manipulation

Il y a 2 techniques pour effectuer le test de stérilité, ces techniques sont :

- ✓ Ensemencement direct sur les flacons (bouillon)
- ✓ Filtration sur membrane "Steritest"

Manipulation

Avant toute manipulation faire le nettoyage de paillasse avec de l'alcool à 70° et assurer que tout le matériel est à côté de la zone de travail (un rayon de 20cm entre les deux becs bunsen ce qui correspond à la zone stérile).

Matériels et méthodes

▪ Ensemencement direct sur les flacons (bouillon)

Principe

2 flacons de bouillon pour chaque milieu de culture (TSB et TG) sont nécessaires.

Procéder de la manière suivante :



5 ml correspondent au volume de produit à analyser donc volume requis est de 20 ml.

Le volume final de chaque flacon de bouillon est de 50 ml.

Manipulation

Flamber les ampoules avant de les casser, et casses les près de la flamme puis à l'aide de la seringue flambé prélever le contenu de chaque ampoule.

Introduire 5 ml de produit à analyser dans chacune de 4 flacons (2TSB, 2TG).

Stériliser les matériels pendant la manipulation.

Pour les témoins négatifs

Pour les témoins négatifs utiliser le sérum salé et procéder de la même manière que pour le produit.

Remarque : Sur les flacons marquer les milieux de culture, le produit à analyser ainsi que la date de l'opération.

Incubation

L'incubation des bouillons se fait pendant 14 jours, à 25°C pour le bouillon TSB et à 35°C pour le TG.

Lecture

Une surveillance journalière est faite pendant 14 jours d'incubation pour vérifier la présence ou l'absence de croissance des microorganismes. Dans le cas d'absence de croissance, le produit est stérile et dans le cas où il y a une croissance, l'isolement et l'identification de germe doit être faite.

Matériels et méthodes

- Filtration sur membrane (dénombrement après concentration) "steritest"

Le principe

Procéder à une filtration sur membrane en esters de cellulose de porosité bien définie (0.45 µm) susceptible de retenir les bactéries.

Manipulation

Pour cette analyse utiliser, 100 ml de bouillon TSB et 100 ml de bouillon TG.

Filtrer le produit à analyser, ensuite compléter avec les milieux d'enrichissement (TSB et TG), l'incubation et la lecture se fait de la même manière que pour l'ensemencement direct.

2.2.3. Essais Pharmaco-toxicologiques

Au niveau de l'unité pharmaco-toxicologique se font les tests *in vivo*, sur souris et cobayes.

Les souris et les cobayes sont maintenus dans des conditions de température de 18°C - 23°C et d'humidité de 55%- 65%.

Contrôle de la toxicité anormale

Principe

La toxicité anormale est un test de sécurité des produits biologiques injectables. Ce test est appliqué aux animaux de laboratoire auxquels le produit fini est injecté. Evalue la tolérance du produit injecté après une période définie.

L'injection intra-péritonéale permet le maximum d'absorption de la préparation et par conséquence permet de transférer à l'animal une quantité maximale de toute substance toxique présente dans la préparation.

Pour que le test soit satisfaisant tous les animaux doivent survivre sans présenter des symptômes particuliers des maladies ou de perte de poids.

Mode opératoire

- Préparation des animaux pour le test « souris et cobayes »

Avant de lancer le test de toxicité anormale, sélectionner des souris et des cobayes.

La pesée avant le test

Peser les animaux individuellement à l'estomac vide (le jour 0, c'est la période d'inoculation) en respectant l'intervalle du poids donné par la Pharmacopée Européenne 8^{ème} édition.

- ✓ Les souris : entre 17 g et 24 g
- ✓ Les cobayes : entre 250 g et 400 g

Les souris et les cobayes doivent être en bonne santé.

Matériels et méthodes

Le nombre des animaux à utiliser

- ✓ **Les souris** : utiliser 6 souris (1 témoin et 5 pour le test).
- ✓ **Les cobayes** : utiliser 3 cobayes (1 témoin et 2 pour le test).

Le code de coloration des animaux

Colorer les animaux avec la Fuchsine et le violet de gentiane.

- ✓ **Les souris**

Souris 1 : Tête rouge "TR"

Souris 2 : Queue rouge "QR"

Souris 3 : Tête bleu "TB"

Souris 4 : Queue bleu "QB"

Souris 5 : Tête rouge Queue bleu "TRQB"

Souris témoin : non colorée

- ✓ **Les cobayes**

Cobaye 1 : Tête rouge "TR"

Cobaye 2 : Tête bleu "TB"

Cobaye témoin : non coloré

- **Le test proprement dit "souris et cobayes"**

- ✓ **Les souris**

Injection

L'injection suit l'ordre de coloration, injection intra-péritonéale à chacune des 5 souris et un placebo sur le témoin, la dose administrée est la dose humaine de préparation sans dépasser 1 ml par souris.

Noter la date d'inoculation sur la fiche correspondant au test.

Conditions de vie des souris durant le test

Durant le test le groupe des souris est mis dans une cage convenable et reçoit des aliments adéquats et de l'eau. Une température adéquate de l'environnement est maintenue durant la durée du test.

Matériels et méthodes

L'observation

Observer les souris pendant 7 jours après injection pour détecter des mortalités éventuelles ou des symptômes de maladies.

Faire l'observation des souris les 3 premiers jours (J_1 , J_2 , J_3), ensuite remplir la fiche du test, en utilisant :- (O) pour souris en bonne santé

- (M) pour souris malade

- (+) pour souris morte

La pesée durant le test (3^{ème} jour) : Le 3^{ème} jour peser individuellement chaque souris et noter leur poids (gain/perte de poids) sur la fiche du test.

Continuer l'observation des souris les 4 derniers jours (J_4 , J_5 , J_6 , J_7) et remplir la fiche du test.

Le dernier jour (7^{ème} jour), peser individuellement les souris et noter leur poids sur la fiche de résultat (le poids ne doit pas être inférieur au poids initial).

✓ Les cobayes

Injection

L'injection suit l'ordre de coloration, injection intra-péritonéale à chacun des 2 cobayes et un placebo sur le témoin; la dose administrée est la dose humaine de préparation sans dépasser 5 ml par cobayes.

Noter la date d'inoculation sur la fiche correspondant au test.

Conditions de vie des cobayes durant le test

Durant le test le groupe des cobayes est mis dans une cage convenable et reçoit des aliments adéquats et de l'eau. Une température adéquate de l'environnement est maintenue durant la durée du test.

L'observation

Observer des cobayes pendant 7 jours après injection pour détecter des mortalités éventuelles ou des symptômes de maladies.

Faire l'observation des cobayes les 3 premiers jours (J_1 , J_2 , J_3), ensuite remplir la fiche du test, en utilisant :- (O) pour cobaye en bonne santé

- (M) pour cobaye malade

- (+) pour cobaye morte

La pesée durant le test (3^{ème} jour) : Le 3^{ème} jour peser individuellement chaque cobaye et noter leur poids (gain/perte de poids) sur la fiche du test.

Continuer l'observation des cobayes les 4 derniers jours (J_4 , J_5 , J_6 , J_7) et remplir la fiche du test. Le dernier jour (7^{ème} jour), peser individuellement les cobayes et noter leur poids sur la fiche de résultat (le poids ne doit pas être inférieur au poids initial).

Matériels et méthodes

Interprétations et critères d'acceptation "souris et cobayes"

L'échantillon satisfait au test de toxicité anormale ou est conforme à l'essai si :

- Aucun(e) des souris/cobayes ne manifeste des signes de morbidité.
- Mortalité de plus d'une souris /cobayes, le produit doit être rejeté.
- Mortalité de l'un des souris/cobaye ou manifestation des signes de morbidité, le test doit être répéter.

La répétition du test (de l'essai)

Le produit satisfait à l'essai, si aucun des souris/cobayes de deuxième groupe ne meurt ou ne manifeste de symptômes de maladies au cours de la période prescrite.

À la fin noter le résultat final du test sur la fiche de contrôle et le faire valider.

La seringue utilisée pour l'injection c'est une seringue hypodermique graduée à 1 ml, et l'injection se fait dans un angle de 45°.

À la fin du test tous les animaux utilisés pendant le test doivent être sacrifiés, car ils sont déjà immunisés et ne pourra pas être utilisé à nouveaux.

2.2.4. Essais immunochimiques

Au niveau de l'unité immunochimie se font les tests de l'activité et de l'identité des vaccins, par une méthode immuno-enzymatique (méthode ELISA).

Principe

Monolisa™ HBs Ag ULTRA est une technique immuno-enzymatique de type "sandwich" en 1 temps utilisant des anticorps monoclonaux et des anticorps polyclonaux sélectionnés pour leur capacité à se lier aux différents sous-types de l'Ag HBs actuellement reconnus par l'OMS et la plupart des souches variantes de l'hépatite B.

La phase solide de Monolisa™ HBs Ag ULTRA est sensibilisée avec des anticorps monoclonaux.

Les conjugués de Monolisa™ HBs Ag ULTRA sont basés sur l'utilisation des anticorps monoclonaux de souris et des anticorps polyclonaux de chèvre contre l'Ag HBs. Ces anticorps sont couplés à la peroxydase.

Mode opératoire

▪ Préparation des réactifs

Avant utilisation des réactifs de la trousse Monolisa™ HBs Ag ULTRA, laisser le kit 15 minutes à température ambiante (18-30°C).

Matériels et méthodes

▪ Réactifs prêts à l'emploi

Réactif 1 (R1) : Microplaque

Chaque support cadre contenant 12 barrettes est conditionné en sachet aluminium scellé. Couper le sachet à l'aide de ciseaux ou scalpel 0,5 à 1 cm au-dessus de la soudure. Ouvrir le sachet et sortir le cadre. Replacer dans le sachet les barrettes inutilisées. Refermer le sachet soigneusement et le replacer à +2°-8°C.

Réactif 3 (R3) : Contrôle Négatif

Réactif 4 (R4) : Contrôle Positif

Réactif 10 (R10) : Solution d'arrêt

▪ Réactifs à reconstituer

Solution de lavage (concentrée 20X) : Réactif 2 (R2)

Diluer au 1/20^{ème} la solution de lavage R2 dans de l'eau distillée. Préparer 800 ml pour une microplaque de 12 barrettes.

Conjugué (R6 + R7)

Taper doucement le flacon de conjugué lyophilisé (R7) sur la paillasse pour détacher toute substance pouvant adhérer au bouchon de caoutchouc.

Ouvrir le flacon de conjugué lyophilisé (R7) et y transvaser le contenu d'un flacon de diluant pour conjugué (R6).

Reboucher et laisser reposer 10 minutes en homogénéisant de temps en temps pour faciliter la dissolution.

Solution de révélation enzymatique (R8 + R9)

Diluer le réactif R9 dans le réactif R8 au 1/11^{ème} (exemple : 1 ml de réactif R9 dans 10 ml de réactif R8) sachant que 10 ml sont nécessaires et suffisants pour traiter 12 barrettes. Cette solution reste stable 6 heures à l'obscurité, Homogénéiser.

▪ Préparation de la gamme

D'abord prendre un pool (mélange des vaccins) 5 flacons de 1 ml (monodose) au total il faut avoir 5ml, pour les étapes suivants et la référence (produit donné dans le kit).

Passer à l'étape des dilutions de 1/10^{ème} au 1/64000^{ème}.

Ensuite prendre 9 tubes, où le premier tube doit contenir 900µL de BSA et 100µL de standard.

Matériels et méthodes

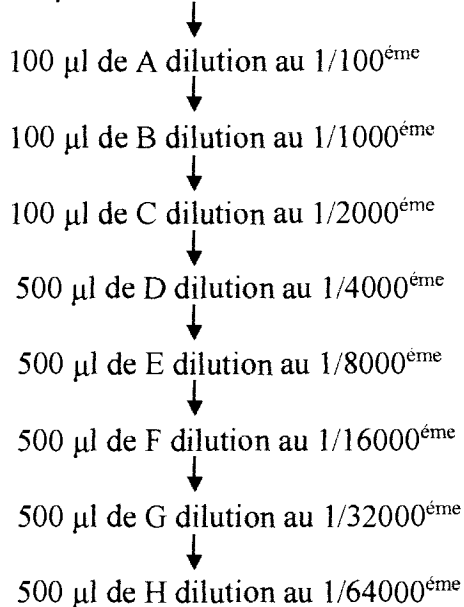
Faire 9 tubes standards et 9 tubes vaccin

Les dilutions

De 1-3 : A-B-C : prendre 100 μ L

De 4-8 : D-E-F-G-H : prendre 500 μ L

Donc : 100 μ l standard dilution au 1/10^{ème}



Les dilutions sont faites en 3 essais (triple essai) pour le standard et pour le vaccin.

Travailler seulement avec les 4 dernières dilutions à triple essai (de 1/8000^{ème} à 1/64000^{ème}), ensuite prendre les barrettes et faire le chemin de la plaque.

Chemin de la plaque

A : contrôle négatif (C-)

B : contrôle négatif (C-)

C : contrôle négatif (C-)

D : contrôle négatif (C-)

E : contrôle positif (C+)

F : échantillon-standard

G : échantillon

H : échantillon

Lecture des plaques Monolisa™ HBs Ag ULTRA

Pour chaque dilution faire 3 essais (les 4 dernières dilutions), soit pour le standard soit pour les échantillons.

Matériels et méthodes

Mettre 100µL de standard ainsi que l'échantillon dans chaque cupule, puis on fait :

- **Le dépôt du conjugué :** déposer 50µL de conjugué et mélanger 5 fois par aspiration ensuite incubé pendant une heure et demi (1:30H) à 37°C et procéder à un lavage manuel soit automatique.
- **Le dépôt de substrat :** déposer 100µL de substrat et la réaction se développe après 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante de 25°C.
- **Le dépôt de la solution d'arrêt :** déposer 100µL de la solution d'arrêt dans chaque cupule.
- **La dernière étape est la lecture :** qui se fait par le lecteur ELISA à l'aide d'un logiciel.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Résultats et discussion

3.1 Résultats de l'analyse physico-chimique

Tableau 4 : Résultats de la limpidité

Test	Résultat		Norme
	Lot 1	Lot 2	
Limpidité et opalescence	Conforme	Conforme	Solution blanchâtre, légèrement opaque

Référence : La Pharmacopée Européenne 8ème édition 2013

En effet, après une légère agitation des flacons et une lecture en lumière indirecte, on observe une solution opaque (due à la présence d'hydroxyde d'aluminium).

Tableau 5 : Résultats du volume extractible (V_{ext})

	$V_{totale}(ml)$	N° des flacons	$V_{moyenne}(ml)$	$V_{nominale}$
Lot 1	5,5	5	1.1	$1 < V < 1.2$ (ml)
Lot 2	5,5	5	1.1	$1 < V < 1.2$ (ml)

Référence : La Pharmacopée Européenne 8ème édition 2013

Lors de la détermination de volume extractible du vaccin Hépatite B rADN, le résultat doit être exprimé en ml, en tenant compte que pour les récipients où le volume nominal est inférieur ou égale à 2 ml, il ne faut pas qu'il soit inférieur à la somme des volumes nominaux examinés collectivement.

Tableau 6 : Résultats du pH

	pH	Norme
Lot 1	7,01	6,40 -7,40
Lot 2	6,99	6,40 -7,40

Référence : La Pharmacopée Européenne 8ème édition 2013

Les résultats du pH se trouvent dans l'intervalle acceptable selon la Pharmacopée Européenne.

Résultats et discussion

▪ Dosage d'aluminium (Al³⁺)

La teneur en Aluminium est donnée suite l'application de la formule suivant :

$$\text{Teneur en l'aluminium (mg/ml)} = \frac{(V_t - V_x) \times 0,5396}{V_e}$$

- Lot 1 : Essai 1 = 7,8 ml
Essai 2 = 7,8 ml
- Lot 2 : Essai 1 = 7,8 ml
Essai 2 = 7,8 ml
- Volume témoin = 10,3 ml
- Volume d'échantillon = 2 ml

Le calcul :

$$\text{Teneur en l'aluminium (mg/ml)} = \frac{(10,3 - 7,8) \times 0,5396}{2} = 0,6745 \text{ mg/ml}$$

Où les valeurs obtenues sont exprimés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 7 : Résultats du dosage d'aluminium

	Teneur en l'Al (mg/ml)	Norme (mg/ml)
Lot 1	0,6745mg/ml	0,50 - 0,80 mg/dose
	0,6745mg/ml	0,50 - 0,80 mg/dose
Lot 2	0,6745mg/ml	0,50 - 0,80 mg/dose
	0,6745mg/ml	0,50 - 0,80 mg/dose

Référence : La Pharmacopée Européenne 8ème édition 2013

La teneur en Aluminium est de 0,6745mg/ml, cette teneur correspond aux normes requises par la Pharmacopée Européenne.

Tableau 8 : Résultats du dosage de thiomersal

	Taux en thiomersal (mg/dose)	Taux en Thiomersal (%)	Norme (%)
Lot 1	0,0240 mg/dose	0,0048%	(0,00300 - 0,00575)%
	0,0240 mg/dose	0,0048%	(0,00300 - 0,00575)%
Lot 2	0,0220 mg/dose	0,0044%	(0,00300 - 0,00575)%
	0,0220 mg/dose	0,0044%	(0,00300 - 0,00575)%

Référence : La Pharmacopée Européenne 8ème édition 2013

Résultats et discussion

D'après l'application de la méthode spectrophotométrique les taux en thiomersal sont admissibles selon les exigences de la Pharmacopée Européenne.

3.2 Résultats de l'analyse microbiologique

Tableau 9 : Résultats du contrôle de stérilité bactérienne et fongique

Test	Résultat		Norme
	Lot 1	Lot 2	
Stérilité bactérienne et fongique	Stérile	Stérile	Absence de croissance des micro-organismes

Référence : La Pharmacopée Européenne 8ème édition 2013

Après l'analyse microbiologique, l'absence de croissance des micro-organismes indique que le produit est stérile.

3.3 Résultats de l'analyse pharmaco-toxicologique

Tableau 10 : Résultats du contrôle de la toxicité anormale

Test	Résultat		Norme
	Lot 1	Lot 2	
Toxicité anormale	Animaux en bonne santé	Animaux en bonne santé	Aucun des animaux ne doit mourir ou présenter de symptômes de maladie

Référence : La Pharmacopée Européenne 8ème édition 2013

À la fin du test aucun des animaux n'ont été malades ni perdu leur poids, le test confirme l'innocuité du vaccin.

3.4 Résultats de l'analyse immunochimique

Tableau 11 : Résultats du contrôle d'identité et d'activité du principe actif *in vitro*

Test	Résultat		Norme
	Lot 1	Lot 2	
L'identité de l'Ag HBs	Conforme	Conforme	Positif pour l'Ag HBs
L'activité du vaccin	Conforme	Conforme	Concentration supérieur ou égale ($\geq$) 20µg/ml

Référence : La Pharmacopée Européenne 8ème édition 2013

Résultats et discussion

Concernant les essais immunologiques, le test ELISA est un test complexe qui nous permet d'identifier et quantifier l'antigène HBs présent dans le vaccin.

Le résultat été positif pour l'identité de l'Ag HBs ainsi que l'activité du vaccin (Hépatite B rADN).

CONCLUSION

Conclusion

Les médicaments issus de la biotechnologie sont des médicaments innovants, leur production est un véritable phénomène de l'innovation et de la recherche dans l'industrie pharmaceutique, dans l'espoir de soigner un jour des maladies encore incurables.

Le contrôle du vaccin hépatite B à l'institut Pasteur d'Algérie a pour but de confirmer trois paramètres essentiels qui sont : pureté, efficacité, et sécurité.

En effet, le contrôle de pureté permet de confirmer la quantité résiduelle des impuretés, c'est-à-dire la trace de résidus à une infime quantité et qui est admissible à une certaine norme donnée.

Le contrôle de l'efficacité permet de affirmer qu'après l'injection du vaccin le patient sera immunisé ou non, l'efficacité se fait par le test ELISA, où le contrôle initial validée d'abord par test *in vivo* et puis *in vitro* selon la Pharmacopée Européenne 8^{ème} édition. En fin les essais de sécurité permettent de démontrer l'innocuité et la stérilité du vaccin.

Cette démarche en plus d'assurer la qualité du vaccin révèle aux autorités de santé l'utilisation des normes strictes de BPF et BPL et ainsi d'écarter le risque d'une mauvaise qualité du vaccin.

Il est impératif pour l'Algérie à se lancer dans quelques années dans la fabrication de biomédicaments pour ne plus dépendre de l'étranger en vue d'améliorer leurs disponibilités au marché.

L'un des objectifs de l'industrie pharmaceutique en Algérie est d'être un pôle d'excellence régional dans le domaine de la biotechnologie qui rayonnerait sur l'Afrique et le Moyen-Orient (projet de la production des biomédicaments à la nouvelle ville de Sidi Abdellah).

Les enjeux futurs questionnent notre capacité à fournir des compétences de pointe adaptées aux nouvelles méthodes de Recherche et Développement. En effet, il est indispensable de mieux traduire les savoirs en compétences et de former des étudiants sachant travailler dans des modalités multidisciplinaires, pour renforcer la compétitivité des ressources humaines en Biotechnologies pharmaceutiques en Algérie, en proposant notamment des rapprochements Industrie-Universités, à travers d'actions de communication, de projets collaboratifs en matière de formation, et en déclinant une partie du plan d'action au niveau régional avec le soutien des pôles de compétitivité.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Ouvrages :

1. Afssaps, Des Médicaments Issus Des Biotechnologies Aux Médicaments Biosimilaires, Rapport d'expertise. Juillet 2011.
2. Alan Doyle and J. Bryan Griffiths, Cell and Tissue Culture, Laboratory Procedures in Biotechnology. 1998.
3. Aluizio Borém, Fabrício R. Santos, David E. Bowen, Understanding Biotechnology. January 17, 2003.
4. Amgen Inc, Introduction à la Biotechnologie, Pioneering science delivers vital medicinesTM. 2009.
5. Anne Valère Marionnet, Pharma - Biotech, Pme, Innovation technologique et Secteurs d'application. 2004.
6. ANSM, Les médicaments biosimilaires, Etat des lieux (Rapport) Septembre 2013.
7. Ashutosh Kar : Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. 2007.
8. Baneyx F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. Current Opinion in Biotechnology. 1999.
9. Campus France, La recherche en biotechnologies en France. Mars 2013
10. Clotide Clément, Génériques et Biosimilaires, "Les Biosimilaires versus les Génériques". Juin 2012.
11. Commission européenne, Ce qu'il faut savoir sur les médicaments biosimilaires
12. Covic A and Kuhlmann MK, Biosimilaires, Recent developpement, Int Urol Nephrol 2007.
13. Daan J.A. Crommelin, Robert D. Sindelar and Bernd Meibohm, Pharmaceutical biotechnology: fundamentals and applications - 3rd edition.
14. Définitions des Biotechnologies
15. Eric S. Grace, Biotechnology Unzipped Promises and Realities. 1997.
16. François Chast, Jean-Claude Dousset, Médicament et santé publique. 1985.
17. Gary Walsh, Biopharmaceuticals, Biochemistry and Biotechnology Second Edition. 2003.
18. Gary Walsh, Pharmaceutical biotechnology: Concepts and applications. 2007.
19. Heinrich Klefenz, Industrial Pharmaceutical Biotechnology. 2002.
20. Jean-Olivier Irisson, Cours de Biologie, Licence pluridisciplinaire.
21. Jonathan Toubreau, L'industrie pharmaceutique et les biotechnologies, Complément à la conférence « Les jeunes, la chimie et les sciences de la vie » Conception et réalisation. 2013.

Références bibliographiques

22. Kimball R. Nill, Glossary of biotechnology terms, 3rd edition. 2002.
23. LEEM, Comité Biotechnologies, Biomédicaments en France " Etat des Lieux 2004".
24. LEEM, Comité Biotechnologies, Biomédicaments en France " Etat des Lieux 2014".
25. LEEM, Bioproduction, Etat des lieux et recommandations pour attractivité de la France "Rapport de Synthèse". 2008.
26. M. Yves Legrain, Les Biomédicaments: des opportunités à saisir pour l'industrie pharmaceutique. 2009.
27. Madame Dhelemme, Définitions de pharmacologie générale UE 2.1
28. Makrides S.C, Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli Microbiological Reviews 1996.
29. Mepha, Biosimilaires : Opportunités thérapeutiques grâce à une nouvelle génération de médicaments (Les médicaments à l'arc-en-ciel).
30. Mellstedt H et al, The challenge of biosimilars. Annals of oncology 2007.
31. Miladi Nawfel, Production de protéines recombinantes en système acellulaire : Industrialisation et réglementation. 2012.
32. Nelly Weinmann, R&D des compagnies pharmaceutiques: Ruptures et mutations. Janvier 2008
33. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development): The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability. 2001.
34. Philippe Goujon, From Biotechnology to Genomes, The Meaning of the Double Helix. 2001.
35. Poitou P, Les missions du conditionnement en termes de sécurité et de bon usage du médicament. Ann pharm francaises 2003.
36. Poncel G, La formulation des médicaments : Contraintes et stratégies.
37. Potocki-Veronese G, Produire une protéine recombinante. Principes et méthodes de biologie moléculaire.
38. Ruth Freitag, Ph.D, Synthetic Polymers for Biotechnology and Medicine. 2003.
39. Scheper T, Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology, Vol. 69/70/75/76, Modern Advances in Chromatography. 2000.
40. Turbica I, Purification des protéines recombinantes.
41. Warm F M, Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells, Nature Biotechnology 2004.

Références bibliographiques

Textes législatifs et réglementaire :

- 42. Loi N° 08-13 du 20 Juillet 2008 modifiant et complétant la loi N° 85-05 du 16 Février 1985 relative à la protection et à la promotion de la santé.
- 43. Loi N° 85-05 du 16 Février 1985 relative à la protection et à la promotion de la santé. Journal officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire N° 8 du Dimanche 17 Février 1985.

Sites internet :

- 44. Assemblée générale FEB, 1989 : <http://www.eurodoctor.it/biotech.html>
- 45. Bio industry Association: <http://www.bioindustry.org>
- 46. Définition du médicament, vulgarismedical :
<http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie-medicale/medicament>
- 47. Encyclopédie Larousse : <http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical>
- 48. Organisation des Nations-Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) :
<http://www.fao.org/DOCREP/003/X3910E/X3910E00.htm>.
- 49. The Biotech life sciences dictionary: <http://www.eurodoctor.it/biotech.html>

ANNEXES

Liste des annexes

Annexe I : Fiches des résultats des essais physico-chimiques

Annexe II : Fiche des résultats des essais microbiologiques

Annexe III: Fiche des résultats des essais pharmaco-toxicologiques

Annexe IV: Fiches des résultats des essais immunologiques

ANNEXE I

Fiches des résultats des essais physico-chimiques

MINISTÈRE DE LA SANTÉ, DE LA POPULATION ET DE LA RÉFORME HOSPITALIÈRE

وزارة الصحة والسكان وإصلاح المستشفيات



INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

معهد باستور بالجزائر

Ed n° 02

Date d'application : 01/03/14

Département de contrôle des produits biologiques

Laboratoire de contrôle de la qualité- LCQ

CODE:

Alger, le

Nom du produit Nom de la spécialité N° lot N°S/Lot N° d'ordre
Vaccin hépatite B ADNr adsorbé Adulte

Producteur	SII
Date de mise à disposition du contrôle	
Format de répartition	Ampoule
Volume réparti	1 ml
Nombre de doses /unité	1 dose

Fiche de résultats

Unité Physico-Chimie Contrôle Physico-Chimique

Techn°	Date Début	Date Fin	Contrôles	Résultats	Normes	Références
			Limpidité et opalescence			PE 8ème Ed
			Degré de coloration des liquides			PE 8ème Ed
			Aspect liquide		Suspension blanche opaque ou l'adjuvant minéral tend à se déposer lentement au repos	NI
			PCV du vaccin			

Conclusion	Satisfaisant
	Non satisfaisant

Nom de l'opérateur		Date et signature	
Responsable du laboratoire		Date et signature	

Nouvel Institut Pasteur d'Algérie Dely Ibrahim -Route du petit Staoueli/ Tel/Fax 021.34.24.52/



INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

معهد باستور بالجزائر

Département de contrôle des produits biologiques

Laboratoire de contrôle de la qualité- LCQ

Ed n° : 03

Date d'application : 08/02/15

CODE:

Alger, le

Nom du produit	Nom de la spécialité	N° lot	N°S/Lot	N° d'ordre
Vaccin hépatite B ADNr Ad				
Producteur		SII		
Date de mise à disposition du contrôle				
Format de répartition		Ampoules		
Volume repart		1 ml		
Nombre de doses /unité		1 dose - Monodose		

Fiche de résultats

Unité Physico-Chimie

Contrôle Physico-Chimique

N° POS	Date Début	Date Fin	Contrôles	Résultats	Normes	Références
			Mesure du pH		6.40 - 7.40	NI
			Volume extractible		≥ Volume nominal et pas plus de 1.20 ml	NI
			Dosage de l'aluminium (AL ³⁺)		0.50 - 0.80 mg/dose	NI
			Dosage du thiomersal		(0.00300 - 0.00575)%	NI

Conclusion	Satisfaisant	
	Non satisfaisant	

Nom de l'opérateur

Date et signature

Responsable du laboratoire

Date et signature

Nouvel Institut Pasteur d'Algérie Dely Ibrahim, Route du petit Staoueli/ Tel/Fax 021.34.24.52

ANNEXE II
Fiche des résultats des essais microbiologiques



INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

معهد باستور بالجزائر

Département de contrôle des produits biologiques

Laboratoire de contrôle de la qualité- LCQ

CODE:

Alger, le

Nom du produit

Nom de la spécialité

N° lot

N°S/Lot

N° d'ordre

Producteur		N° de lot du TG	
Date de mise à disposition du contrôle		N° de lot du TSB	
Format de répartition		N° de lot des seringues	
Volume repart		N° de lot du diluant	
Nombre de doses /unité		N° de lot du solvant à 9g/L	

Unité bactériologie

Contrôle de stérilité

Contrôle de stérilité bactérienne et fongique – PE 8ème Ed (2.6.1)

Contrôle de stérilité N°

Méthode d'ensemencement direct

Méthode avec filtration sur membrane

Contrôle en flacons	Contrôle avec filtration sur membrane
Date de début du contrôle	Date de début du contrôle

Date de lecture	Thioglycolate à 35°C	Contrôle Négatif TG	Trypticase soja à 25°C	Contrôle Négatif TSB

Cas de trouble non spécifique Incubation au moins 4 jours de 1ml du milieu initial dans un nouveau milieu	Milieu TG 35°C		Conclusion	Sterile	
	Milieu TSB 25°C			Non stérile	
Date de fin du test					
Norme : PE 8ème Ed (2.6.1)				Absence de croissance bactérienne et fongique	

Nom de l'opérateur	Date et signature
Responsable du laboratoire	Date et signature

Nouvel Institut Pasteur d'Algérie Dely Ibrahim – Route du petit Staoueli/ Tel/Fax 021.34.24.52/

ANNEXE III

Fiche des résultats des essais pharmaco- toxicologiques

MINISTÈRE DE LA SANTÉ, DE LA POPULATION ET DE LA RÉFORME HOSPITALIÈRE

وزارة الصحة والسكان وإصلاح المستشفيات



INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

معهد باستور بالجزائر

Département de contrôle des produits biologiques

Laboratoire de contrôle de la qualité- LCQ

Ed n° : 02

Date d'application : 02/03/15

CODE:

Alger, le

Nom du produit	Nom de la spécialité	N° lot	N°S/Lot	N° d'ordre
----------------	----------------------	--------	---------	------------

Producteur	
Date de mise à disposition du contrôle	
Format de répartition	
Volume réparti	
Nombre de doses /unité	
Volume de solvant/récepteur	

Unité Pharmaco-Toxicologie
Contrôle de toxicité anormale
Méthode biologique (2.6.9) - PE 8eEd

N° de l'essai

Volume d'inoculation	Voie d'administration	Animaux utilisés	Nbre Ech	Espèce / lot
----------------------	-----------------------	------------------	----------	--------------

Identification individuelle	Jours d'observation							Masses corporelles et dates			
	1	2	3	4	5	6	7	Initiale	Date	Finale	Date
Souris											
TR											
QR											
TB											
QB											
TRQB											
T											
Cobayes											
TR											
QR											
T											

O = Animal en bonne santé

M = Animal malade

- = Animal mort

Date de Début	Norme	Date de fin	Aucun des animaux ne doit mourir ou présenter de symptômes de maladie	Date de remise	Référence	PE 8eEd
	Conclusion					

Nom de l'opérateur		Date et signature	
Responsable du laboratoire		Date et signature	

Nouvel Institut Pasteur d'Algérie Dely Ibrahim -Route du petit Staouelli/ Tel/Fax 021.34.24.52/

ANNEXE IV

Fiches des résultats des essais immunologiques

MINISTÈRE DE LA SANTÉ, DE LA POPULATION ET DE LA RÉFORME HOSPITALIÈRE

وزارة الصحة والسكان وإصلاح المستشفيات

Ed n° 01

Date d'application : 08/04/15



INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

معهد باستور بالجزائر

Département de contrôle des produits biologiques

Laboratoire de contrôle de la qualité- LCQ

CODE:

Alger, le

Nom du produit	Nom de la spécialité	N° lot	N°S/Lot	N° d'ordre
Vaccin hépatite B ADN recombinant				
Producteur	SII			
Date de mise à disposition du contrôle				
Format de répartition				
Volume réparti				
Nombre de doses /unité				

Unité immunologie

Contrôle d'activité in vitro (ELISA)

Méthode immunochimique (2.7.1) PE 86Ed

Vaccin hépatite B ADN recombinant

Activité du standard	N° de lot du standard	Type de Kit Elisa utilisé	N° de lot du Kit
Résultat du vaccin à examiner			
Date de Début	Date de fin	Date de remise	
Normes	Activité du vaccin Hépatite B ADN recombinant	$\geq 20\mu\text{g/ml}$	Référence NI
Conclusion			

Nom de l'opérateur	Date et signature
Responsable du laboratoire	Date et signature

Nouvel Institut Pasteur d'Algérie Dely Ibrahim -Route du petit Staoueli- Tel/Fax 021.54.24.52

MINISTÈRE DE LA SANTÉ, DE LA POPULATION ET DE LA RÉFORME HOSPITALIÈRE

وزارة الصحة والسكان وإصلاح المستشفيات



INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

معهد باستور بالجزائر

Département de contrôle des produits biologiques

Laboratoire de contrôle de la qualité- LCQ

Ed n° : 02

Date d'application : 02/03/15

CODE:

Alger, le

Nom du produit	Nom de la spécialité	N° lot	N°S/Lot	N° d'ordre
Vaccin hépatite B ADN recombinant				

Producteur	
Date de mise à disposition du contrôle	
Format de répartition	
Volume réparti	
Nombre de doses /unité	

Unité immunologie

Contrôle d'identité du principe actif in vitro

Méthode immunochimique (2.7.1) : PE.8eEd

Vaccin hépatite B ADN recombinant

Identité de l'AgHbs

Résultat du standard	Identité de l'AgHbs	
Résultat du vaccin à examiner	Identité de l'AgHbs	

Date de Début		Date de fin		Date de remise	
Normes	Identité de l'AgHbs	Positive	Référence	PE.8eEd	
Conclusion					

Nom de l'opérateur		Date et signature	
Technico-Administratif		Date et signature	
Assurance qualité		Date et signature	

Nouvel Institut Pasteur d'Algérie Dely Ibrahim Route du petit Staoueli/ Tel/Fax 021.34.24.52/

Résumé

Face à la mondialisation du marché pharmaceutique, l'émergence des contrefaçons, l'amélioration de la connaissance des impuretés chimiques toxiques, au développement des biomédicaments et aux évolutions réglementaires, il est important pour l'Algérie, d'actualiser les méthodes d'analyse de contrôle de qualité vers les méthodes plus avancées technologiquement pour améliorer la qualité, efficacité et innocuité des biomédicaments.

Nous nous sommes intéressé dans ce mémoire au suivie des étapes de contrôle de qualité de vaccin hépatite B rADN adulte, flacon unidosé de 1 ml, un médicament issu de la biotechnologie contenant comme principe actif un antigène de surface (AgHBs) de virus hépatite B.

En effet, ce vaccin n'est pas encore produit par l'Institut Pasteur d'Algérie et est importé des laboratoires des pays producteurs (comme par exemple l'Inde et Corée de sud).

Cependant il est contrôlé à l'IPA afin de garantir la qualité, l'efficacité et l'innocuité.

En conclusion, la fabrication d'un biomédicament nécessite de la recherche scientifique et des études approfondie dans des domaines fondamentales et appliquées afin de réaliser les objectifs de l'industrie pharmaceutique en Algérie à savoir être un pôle d'excellence régional dans le domaine de la biotechnologie qui rayonnerait sur l'Afrique et le Moyen-Orient.

Mots clés : médicament biotechnologique, vaccin, production, contrôle qualité

Abstract

Faced with the globalization of the pharmaceutical market, the emergence of counterfeits, improved knowledge of toxic chemical impurities, the development of biopharmaceutics and regulatory changes, it is important for Algeria to update its methods of quality control to the most technologically advanced methods to improve the quality, effectiveness and safety of biopharmaceutics.

In this thesis, we are interested in following the steps undertaken during quality control of hepatitis B rDNA vaccine, 1 ml single dose adult vial, a drug derived from biotechnology containing hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) as the active ingredient.

This vaccine is not yet produced by the Institut Pasteur d'Algérie but imported from laboratories in producing countries (such as India and South Korea). However, it is controlled at the IPA to ensure quality, effectiveness and safety.

In conclusion, the production of biopharmaceutics requires scientific research and in-depth studies in fundamental and applied sciences. Therefore, in order to achieve the objectives of the pharmaceutical industry, Algeria is creating a regional center of excellence in the field of biotechnology that extends the whole of Africa and the Middle East.

Keywords: biopharmaceutical, vaccine, production, quality control

BIOTECHNOLOGIE DES MÉDICAMENTS
FABRICATION ET ÉTAPES DE CONTRÔLE DU VACCIN HÉPATITE B
- INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE -

Résumé

Face à la mondialisation du marché pharmaceutique, l'émergence des contrefaçons, l'amélioration de la connaissance des impuretés chimiques toxiques, au développement des biomédicaments et aux évolutions réglementaires, il est important pour l'Algérie, d'actualiser les méthodes d'analyse de contrôle de qualité vers les méthodes plus avancées technologiquement pour améliorer la qualité, efficacité et innocuité des biomédicaments.

Nous nous sommes intéressé dans ce mémoire au suivie des étapes de contrôle de qualité de vaccin hépatite B rADN adulte, flacon unidosé de 1 ml, un médicament issu de la biotechnologie contenant comme principe actif un antigène de surface (AgHBs) de virus hépatite B.

En effet, ce vaccin n'est pas encore produit par l'Institut Pasteur d'Algérie et est importé des laboratoires des pays producteurs (comme par exemple l'Inde et Corée de sud).

Cependant il est contrôlé à l'IPA afin de garantir la qualité, l'efficacité et l'innocuité.

En conclusion, la fabrication d'un biomédicament nécessite de la recherche scientifique et des études approfondie dans des domaines fondamentales et appliquées afin de réaliser les objectifs de l'industrie pharmaceutique en Algérie à savoir être un pôle d'excellence régional dans le domaine de la biotechnologie qui rayonnerait sur l'Afrique et le Moyen-Orient.

Mots clés : médicament biotechnologique, vaccin, production, contrôle qualité

Auteurs:

JEKE Lloyd Tandavarai
ltjeke@yahoo.com

KAWOOYA Francis
kawooyafrancis@ymail.com

USTÁ Nádia Vanessa Lucas
nadia.lusta@gmail.com

Promotrice: Dr ARAR Karima