

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB – BLIDA



FACULTE DE MEDICINE
DEPARTEMENT DE LA PHARMACIE
THESE D'EXERCICE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

**EVALUATION DE LA QUALITE PHYSICOCHIMIQUE
D'UN BIOSSIMILAIRE ANTIDIABETIQUE**

Session : 2019/2020

Réalisée par :

- **GAMANE Zahia**
- **IZEM Wassila Fella**
- **SERDOUN Sarra**

Encadrée par :

- **Dr. AZZOUZ. L** : Maitre assistante en chimie analytique - USDB-1-

Devant le jury :

- **Président du jury : Dr. BELAIDI. F** Maitre assistante en chimie analytique
- **Examineur : Dr. LACEB. L.** Maitre assistante en chimie thérapeutique
- **Examineur : Dr. BOUCHEKCHOUKH A** Maitre assistante en chimie minérale

Remerciement

En premier lieu nous tenons à remercier Allah, le Tout Puissant, le Miséricordieux, qui nous a donné la force et le courage de mener à bien ce travail.

*Nous tenons tout d'abord à exprimer notre profond respect ainsi que notre gratitude à notre promotrice **Dr. AZZOUZ Leïla**, maître-assistante en chimie analytique - USDB-1- de nous avoir encadré durant la réalisation de ce travail. Ses conseils, sa patience, sa disponibilité et son aide nous ont été très précieux.*

*Nos remerciements s'adressent au président du jury **Dr. BELAIDI.F** ainsi qu'aux membres du jury **Dr. LACEB. L** et **Dr. BOUCHEKCHOUKH A** de l'intérêt et du temps qu'ils elles nous ont accordés en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

*Nous tenons à remercier le Professeur **GHARBI.A**. Responsable du Laboratoire National des Produits Pharmaceutiques qui nous a ouvert les portes du laboratoire et qui a mis à notre disposition l'équipement et le matériel nécessaires à la réalisation de notre étude pratique.*

Nous remercions également l'ensemble de l'équipe de l'unité de chimie du LNCPP

Un grand hommage à tous nos enseignants et enseignantes qui nous ont encadrés durant tout notre cursus universitaire.

Sans oublier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce Travail

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A ma tendre Maman

Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta Bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie.

A mon cher papa

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

« Que Dieu le tout puissant vous préserve, vous accorde santé, bonheur,

Qui étude de l'esprit et vous protège de tout mal. »

A mes chers frères Amar ; Mustapha ceux qui ont eu un grand impact pour surmonter de nombreuses difficultés et pour leurs encouragements

À mes cher petits frères Ayoub et Mohamed ; Je vous souhaite un avenir plein de réussite.

A mes chères sœurs Zineb et Karima pour leurs encouragements permanents et leur soutien moral, je vous souhaite une vie pleine de succès ; de joie et de bonheur

A mes belles-sœurs Iman et Asmaa

A mon amie et ma sœur BAHNAS ibtissam qui J'ai partagé avec elle des moments agréables et inoubliables

A mes nièces et neveux BASMA ; NADA et ANIS

A mon grand-père que ce modeste travail soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Puisse Allah le tout puissant vous garde et vous procure santé et longue vie.

Merci d'être toujours là pour moi

Zahia

Dédicace

Je dédie ce modeste travail particulièrement à mes chers parents, qui ont consacré leur existence pour bâtir la mienne, pour leur patience et motivation dans mes études.

Ce travail représente l'aboutissement du soutien et des encouragements qu'ils m'ont prodigués tout au long de mon parcours scolaire. Quoique je puisse dire je ne saurais point vous remercier comme il se doit.

À ma sœur, la lumière de mes jours, source de mes efforts, merci d'avoir été toujours à mes côtés pour m'encourager et me soutenir dans mes moments difficiles. Je te souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.

À mon soutien moral et source de joie et de bonheur, mon fiancé pour l'encouragement et l'aide qu'il m'a toujours accordé.

À toute ma famille, tout particulièrement ma grand-mère et mes tantes maternelles, votre affection me couvre, votre bienveillance me guide et votre présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

À mes cousins et cousines, vous êtes des amours, que Dieu vous protège et vous guide.

À ma belle-famille, en particulier ma petite belle-sœur, pour son soutien et encouragement.

Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.

Wassila Fella

Dédicace

Je dédie cet événement marquant de ma vie

A la mémoire de mon Papa disparu trop tôt, avant même de partager cette joie avec moi, que dieu te garde en son vaste paradis.

A la lumière de mes jours, celle qui m'a donné vie, qui n'a jamais cessé de formuler des prières à mon égard; ma très chère Maman, merci de m'avoir poussée et motivée dans mes études vois à travers ce travail mon amour sincère et ma gratitude .Que Dieu te garde toujours pour moi mon ange gardien.

A mes chers frères et sœurs ; ma famille, mes amies de promotion, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité.

A tous mes enseignants, tout au long de mes études.

A ma deuxième famille EL MEGREN pour leur aide et leur soutien spécialement Ahmed, à mon petit ange Mouhammed Mouhssen

Sarra

Table des matières

| | |
|------------------------------|-------|
| Remerciement..... | III |
| Dédicace | IV |
| Dédicace | V |
| Dédicace | VI |
| Table des matières | VII |
| Liste Des Tableaux | XI |
| Liste Des Figures | XII |
| Liste Des Annexes | XIII |
| Liste Des Abreviations | XIV |
| Glossaire | XIVII |

CHAPITRE I

Aspect réglementaire pharmaceutique

| | |
|--|----|
| I.Généralités sur le médicament | 5 |
| 1. Définition du médicament | 5 |
| 2. Composition d'un médicament..... | 5 |
| 3. Médicament princeps..... | 6 |
| 4. Médicament générique | 6 |
| 5. Médicament biologique | 6 |
| 6. Médicament biosimilaire | 8 |
| II.Aspects Règlementaires pharmaceutique | 10 |
| 1. Principales fonctions de la réglementation pharmaceutique | 10 |
| 2. Autorités réglementaires..... | 11 |
| 2.1. Autorités internationales..... | 11 |
| 2.1.1. Organisation Mondiale de la Santé (OMS) | 11 |
| 2.1.2. Food and Drug Administration (FDA) | 11 |
| 2.2. Autorités européennes | 12 |
| 2.3. Autorités algériennes | 13 |
| 2.3.1. Ministère de la santé de la Population et de la Réforme Hospitalière (MSRHP)..... | 13 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.3.2. | Direction de la Pharmacie et du Médicament..... | 13 |
| 2.3.3. | Agence Nationale des Produits Pharmaceutiques (ANPP)..... | 14 |
| 3. | Bases réglementaires | 14 |
| 3.1. | GMP européenne ou Bonnes pratiques de fabrication (BPF) | 14 |
| 3.2. | cGMP américaine | 15 |
| 3.3. | Bonnes pratiques du laboratoire (BPL) | 15 |
| 3.4. | Pharmacopées | 16 |
| 3.5. | Normes du Conseil International d'harmonisation (ICH) | 18 |
| 3.6. | Lignes directrices Organisation internationale de normalisation ISO..... | 18 |
| 3.7. | Lignes directives de l'Agence Européenne des Médicaments (EMA)..... | 19 |
| 3.8. | Textes réglementaires algériennes..... | 20 |
| 4. | Autorisation de mise sur le marché (AMM) | 21 |
| 5. | Décision d'enregistrement (DE)..... | 21 |
| 6. | Assurance Qualité (AQ) | 21 |
| 7. | Contrôle de la qualité (CQ) | 22 |

CHAPITRE II

Contrôle de la qualité des médicaments biologiques et biosimilaires

| | | |
|----|--|----|
| 1. | Caractérisation de la substance active | 24 |
| 2. | Contrôle de routine | 25 |

CHAPITRE III

Diabète et antidiabétiques

| | |
|---|----|
| I.GENERALITE SUR LE DIABETE..... | 29 |
| 1. Définition du diabète | 29 |
| 2. Types de diabète | 29 |
| 3. Diagnostic du diabète sucré..... | 31 |
| 4. Traitements du diabète. | 31 |
| II.PRESENTATION DU LIRAGLITUDE | 36 |
| 1. Aspect et présentation du LIRAGLITUDE..... | 36 |

| | | |
|------|---|----|
| 1.1. | Composition | 37 |
| 1.2. | Propriétés physicochimique de LIRAGLUTIDE | 38 |
| 1.3. | Données pharmacologiques..... | 39 |
| 1.4. | Indications thérapeutiques | 40 |
| 1.5. | Contre-indications | 40 |
| 1.6. | Effets indésirables | 40 |
| 1.7. | Interactions | 41 |

CHAPITRE IV

Méthode d'analyse utilisée

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | Chromatographie liquide | 43 |
| 1.1. | Chromatographie liquide à haute performance | 44 |
| 1.2. | Chromatographie HPLC de partage [52][69] | 50 |
| 1.2.1. | Chromatographie de partage sur phase normale (NPLC) | 50 |
| 1.2.2. | Chromatographie de partage sur phase inverse (RPLC) | 51 |
| 1.2.3. | Chromatographie d'exclusion stérique (SE-HPLC)..... | 52 |
| 2. | Grandeurs utilisées en chromatographie | 55 |
| 3. | Test de conformité de système | 59 |

CHAPITRE V

Présentation de terrain de stage

| | |
|---|----|
| Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques LNCPP | 63 |
|---|----|

PARTIE 2 EXPERIMENTATION

| | |
|--------------------|----|
| Problematique..... | 68 |
|--------------------|----|

CHAPITRE I

Contrôle qualite physico-chimique du Liraglutide 6 mg/ml

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | Matériels | 69 |
| 2. | METHODES | 73 |
| 2.1. | Essai de contrôle qualité physico-chimique du Liraglutide 6mg/mL..... | 74 |
| 2.1.1. | Caractères organoleptiques..... | 74 |

| | |
|--|----|
| 2.1.2.Potentiel hydrogène pH | 74 |
| 2.1.3.Identification et dosage du Liraglutide et ses impuretés | 74 |
| 2.1.4.Identification et dosage de HWMP | 76 |
| 2.1.5.Identification et dosage du Phénol | 78 |

RESULTATS ET DISCUSSIONS

| | |
|---|-----|
| 1. Caractères organoleptiques..... | 80 |
| 2. Potentiel hydrogène pH | 80 |
| 3. Identification et dosage du Liraglutide et ses impuretés | 80 |
| 4.Identification et dosage de protéine de poids moléculaire élevé (HMWP)..... | 83 |
| 5.Identification et dosage de phénol..... | 85 |
| CONCLUSION GENERALE | 88 |
| BIBLIOGRAPHIE | 90 |
| RÉSUMÉ ET MOT CLÉS | 100 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : différence entre un médicament générique et un biosimilaire | 9 |
| Tableau 2 : Contrôle de routine les plus fréquents des produits biologiques | 27 |
| Tableau 3 : Caractéristiques cliniques des diabètes de type 1 et 2..... | 30 |
| Tableau 4 : Composition des phases mobiles et stationnaires dans la chromatographie de partage en phase inverse et en phase normale..... | 52 |
| Tableau 5 : Les paramètres du test de conformité..... | 60 |
| Tableau 6 : Limites de paramètres du teste de conformité selon USP..... | 60 |
| Tableau 7 : Les références des méthodes et des critères d'acceptation des tests à réaliser. ... | 73 |
| Tableau 8 : Les conditions chromatographiques d'identification, dosage de Liraglutide et ses impuretés | 74 |
| Tableau 9 : Conditions Chromatographiques pour l'identification et le dosage de (HMWP) | 76 |
| Tableau 10 : conditions chromatographiques pour l'identification et dosage de phénol..... | 78 |
| Tableau 11 : Résumé des résultats de contrôle qualité physico-chimique de LIRAGLUTIDE 6mg/mL | 86 |

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Complexité des médicaments biologiques par rapport un médicament chimique... 7

Figure 2 : la forme extérieure de stylo pré-rempli de la solution injectable à base de LIRAGLUTIDE 6 mg/mL 36

Figure 3: Représentation de forme extérieure d'un Stylo prérempli..... 37

Figure 4 : Forme développée de liraglutide..... 37

Figure 5: Classification des méthodes de chromatographies liquides 43

Figure 6 : Schéma d'un système HPLC. 45

Figure 7 : Schémas de quelques pompes utilisées en HPLC..... 46

Figure 8: Injection avec une boucle : Remplissage de la boucle; et injection dans la colonne. 48

Figure 9 : Structure d'une particule de gel de silice..... 51

Figure 10: Schéma descriptif du mécanisme de la chromatographie d'exclusion stérique..... 53

Figure 11 : Chromatogramme illustrant le T_r , T_m , T_r' 55

Figure 12 : Les largeurs d'une courbe de Gausse. 56

Figure 13 : Exemples d'asymétrie de pic chromatographique 56

Figure 14 : Logo LNCPP..... 63

Figure 15 : Verreries de laboratoires 69

Figure 16:fournitures du laboratoire utilisés dans le contrôle de liraglutide 6mg/ mL 70

Figure 17 : Petits matériels du laboratoire utilisés dans le contrôle du liraglutide 6mg/mL... 71

Figure 18 : Chaine HPLC couplée à un détecteur à barrette de diode (Alliance Waters e 2695-PDAdetector)..... 71

Figure 19 : Aspect de la solution injectable à base de LIRAGLUTIDE 6mg/mL 80

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Type d'insulines disponibles en Algérie (Guide de diabétologie 2015 MSPRH).
..... 98

Annexe 2 : Stratégie de l'insulinothérapie dans le diabète de type 2. 99

LISTE DES ABREVIATIONS

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

AQ : Assurance Qualité

BP : pharmacopée Britannique

BPF : Bonne Pratique de Fabrication

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CGE : Electrophorèse sur Gel Capillaire

CHMP : Comité des Médicaments à usage humain

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CTD : Document Technique Commun

CZE : Electrophorèse en Zone Capillaire

ECBS : Organisme Européen de Certification

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, une méthode immuno-enzymatique

EMA : Agence Européenne des Médicaments

FAO : Food and Agriculture Organization

FDA : Food and Drug Administration. Administration des aliments et de drogues.

GMP : Good Manufacturing Practices. Bonne pratique de fabrication.

GLP-1 : Glucagon Like Peptide-1

GLP-1R: Glucagon Like Peptide-1 Recepteur

HIC : Chromatographie des Interaction Hydrophobique

HOMA-B : modèle d'homéostasie des cellules béta (Le changement dans la fonction des cellules B pancréatiques)

HPLC : Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance

ICH : Conseil International pour l'Harmonisation

IEC : Chromatographie Echangeuse d'Ion

IEF : Focalisation Iso-Electrique

IMC : Indice de Masse Corporelle

ISO : Organisation Internationale de Normalisation

FSH : Hormone Folliculo-Stimulante

ANPP: Agence Nationale des Produits Pharmaceutiques.

kDa : kilo dalton ; unité de masse moléculaire

LNCPP : Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques

LH : Luteinizing Hormone

NF : Formulaire National

NPLC : Chromatographie de partage sur phase normale

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pH : Potentiel Hydrogène

Ph-EUR : Pharmacopée Européenne

Q-PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase en temps réel

RPLC : Chromatographie de partage sur phase inverse

SDS-PAGE : Electrophorèse sur Gel de Sodium Dodécyl Sulfate-Polyacrylamide

SBPs : Produits Biothérapeutiques Similaires.

SEC-UV : Spectro-Electro-Chimie par absorption ultraviolette

TSH : Hormone Stimulant la Thyroïde

USP : Pharmacopée Américaine

UV : Ultra-Violet

VIS : Visible

GLOSSAIRE

Autorité nationale de réglementation des médicaments : Organisme national qui administre, conformément à la législation pharmaceutique nationale, tout le spectre des activités de réglementation des médicaments.

Certificat d'analyses: Liste des méthodes analytiques appliquées à un échantillon en particulier, avec les résultats obtenus, et les critères d'acceptation. Il indique si, oui ou non, l'échantillon répond bien à la spécification [56]

Dosage: Doser (ou titrer) une espèce chimique (molécule ou ion) en solution, c'est déterminer sa concentration molaire dans la solution considérée.

Efficacité : Expression de la mesure dans laquelle des activités ont produit les effets prévus.

Fabrication: Toute activité touchant à l'achat de matières et de produits, à la production, au contrôle de la qualité, à la mise en circulation, à l'entreposage et à la distribution de produits finis ainsi qu'aux contrôles correspondants.

Fiabilité: La fiabilité indique jusqu'à quel point une mesure prise par différentes personnes à différents moments et dans différentes circonstances produit les mêmes résultats.

Impuretés: Les impuretés apparaissent pendant la synthèse du principe actif, elles peuvent comprendre les produits de dégradation, de synthèse, stéréochimique, des produits de réaction secondaires, etc. Elles devraient être identifiées, qualifiées et étudiées sur le plan toxicologique. [1]

Il existe nombreux type d'impureté -selon la pharmacopée européenne depuis sa 5ème édition- peuvent être classés en trois grandes catégories (impureté organique ; inorganique et solvant résiduel).

Méthode analytique: On appelle méthode analytique toute méthode qui fait de l'analyse, dosage ou de recherche d'un ou plusieurs molécules dans un échantillon donné.

Qualité : Ensemble des propriétés et des caractéristiques d'un produit ou d'un service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins explicites ou implicites d'un client. [22]

Spécialité pharmaceutique : Elle est définie comme tout médicament préparé à l'avance, présenté sous un conditionnement particulier et caractérisé par une dénomination spéciale, elle est préparée en milieu industriel dans un laboratoire pharmaceutique. [37]

Substances chimiques de référence (SCR): Appelé Référence Standard (RS) dans la pharmacopée américaine (USP), et Substance chimique de référence (SCR) dans la pharmacopée Européenne.

La substance chimique de référence est définie comme un matériau prévu pour être utilisé dans des essais chimiques et physiques spécifiques, dans lesquels ces propriétés sont comparées aux propriétés des échantillons à examiner. Le degré de pureté d'une telle substance dépend du but de son utilisation. Ils sont classés en étalon primaire et secondaire [79]

INTRODUCTION GENERALE

Contrairement au médicament chimique ou un médicament classique. La biotechnologie permet une innovation des nouvelles thérapies biologiques destinées au traitement des maladies lourdes ou chroniques (cancers ; Diabète ; polyarthrite rhumatoïde ; ...etc.)

Aujourd'hui, le médicament biologique occupe une partie importante dans le marché mondiale des médicaments. Mais à cause de son cout cher ; une nouvelle version a été développé comme des médicaments similaires aux médicaments biologiques sous le nom de **BIOSIMILAIRE**.

L'industrie pharmaceutique algérienne actuellement tente de suivre le rythme du développement mondial dans le domaine de production et fabrication des médicaments biologiques et biosimilaires en cherchant à développer des méthodes de contrôle qualité et en encourageant ses fabrications dans les usines pharmaceutiques agréées.

Un biosimilaire définis comme un médicament similaire et non identique à un médicament biologique de référence déjà commercialisé.

Dans ce contexte, le présent travail a pour but de décrire la démarche de contrôle qualité physicochimique de LIRAGLUTIDE 6mg/mL en vue d'obtenir sa décision d'enregistrement (DE).

Ce document est subdivisé en deux parties :

Une synthèse bibliographique: relative au médicament biologique et biosimilaire ; la réglementation spécifique à ce type de produit ; les méthodes utilisées au contrôle qualité de ces biosimilaires ; ainsi une présentation de la molécule LIRAGLUTIDE 6mg/mL avec son intérêt dans le traitement du diabète type II.

Une partie pratique ; consacrée aux contrôles physicochimiques du produit fini liraglutide 6mg/mL ainsi les résultats obtenus qui font l'objet d'une confirmation de sa qualité.

PARTIE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I
ASPECT REGLEMENTAIRE PHARMACEUTIQUE

I. Généralités sur le médicament

1. Définition du médicament

Selon l'article 208 , de la loi sanitaire algérienne journal officiel 2018 N46, le médicament est défini comme 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, de corriger et de modifier ses fonctions physiologiques ». [39]

Sont notamment considérés comme des médicaments « les produits diététiques qui renferment dans leur composition des substances chimiques ou biologiques ne constituant pas elles-mêmes des aliments, mais dont la présence confère à ces produits, soit des propriétés spéciales recherchées en thérapeutique diététique, soit des propriétés de repas d'épreuve ». [14]

2. Composition d'un médicament

Un médicament est un mélange de nombreuses espèces chimiques. Il contient un ou plusieurs principes actifs et des excipients.

2.1. Principe actif [62]

Une substance active est toute substance destinée à être utilisée pour la fabrication d'un médicament et qui, lorsqu'elle est utilisée dans la production d'un médicament, devient une substance active du médicament. De telles substances sont destinées à fournir une activité pharmacologique ou un autre effet direct pour le diagnostic, la guérison, l'atténuation, le traitement ou la prévention des maladies, ou à produire un effet sur la structure et la fonction du corps. [62]

2.2. Excipients

Un excipient est défini comme « Tout composant, autre que le(s) principe(s) actif(s), qui est présent dans un médicament ou utilisé pour sa fabrication ».

La fonction d'un excipient est de servir de vecteur (véhicule ou base) au(x) principe(s) actif(s), ou d'entrer dans la composition du vecteur, contribuant ainsi à certaines propriétés du

produit telles que la stabilité, l'aspect et l'acceptabilité pour le patient, la facilité de fabrication.

La formulation d'un médicament comprend généralement plusieurs excipients. [5]

2.3. Additifs

D'après le comité FAO-OMS, un additif est défini comme une substance dotée ou non d'une valeur nutritionnelle, ajoutée internationalement à un aliment dans un but technologique, sanitaire, organoleptique ou nutritionnel.

Son emploi doit améliorer les qualités du produit fini sans présenter de danger pour la santé, aux doses utilisées [75]

3. Médicament princeps

Un médicament princeps (d'origine ou de référence) peut être défini comme un médicament original dont la production et la commercialisation ne sont permises qu'au détenteur du brevet de la substance active contenue dans le médicament, et cependant une durée de 20 ans en général. Ce médicament doit nécessairement faire l'objet d'essais cliniques avant l'obtention de l'AMM.

Une copie du produit original peut ensuite être développée et commercialisée par d'autres laboratoires sous forme de médicament générique [24]

4. Médicament générique

Un médicament générique est une copie d'un médicament original rendu possible par la chute du brevet initial dans le domaine public à la fin de la période légale de protection [7]

Le médicament générique est défini comme étant « tout médicament qui a la même composition qualitative et quantitative en principe(s) actif(s), la même forme pharmaceutique, et qui est interchangeable avec la spécialité de référence du fait de sa bioéquivalence démontrée par des études appropriées de biodisponibilité. [38]

5. Médicament biologique [83]

Il s'agit d'un médicament dont la substance active est une substance qui est produite par biotechnologie à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physico-chimique et

biologiques, ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle qualité. [83]

5.1. Complexité des médicaments biologiques

En effet, la substance active biologique n'est pas une simple entité chimique bien définie mais plutôt un ensemble hétérogène de molécules complexes [35]. Cette complexité moléculaire est appelée micro-hétérogénéité intrinsèque.

La plupart des médicaments biologiques sont des protéines complexes, avec une structure particulière dans l'espace permettant de garantir leur efficacité.

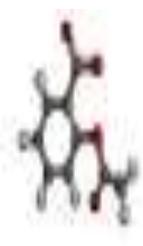
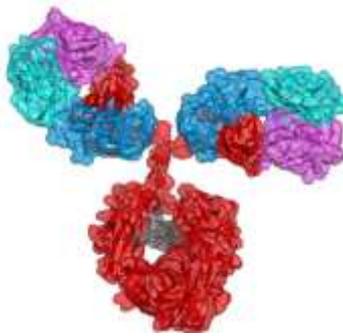
| | | |
|--|--|---|
|  |  |  |
| <p>Aspirine® ~0,18 kDa</p> | <p>Filgrastim ~ 19 kDa</p> | <p>Anticorps monoclonal ~ 150 kDa</p> |

Figure 1 : Complexité des médicaments biologiques par rapport un médicament chimique[34][32]

5.2. Principales classes pharmacologiques des médicaments biologiques [83]

Il existe plusieurs classes thérapeutiques, les principales classes sont les suivantes : [83]

- **Hormones:** par exemple
 - ✓ Somatropine (Hormone de croissance)
 - ✓ la FSH et la LH recombinante (Hormone de la stérilité féminine)
 - ✓ La TSH (thyroestimuline hormone)
 - ✓ Insuline humaine
 - ✓ Glucagon
 - ✓ Les agonistes du récepteur au GLP1incrétinomimétiques (exenatide, **liraglutide**, dulaglutide)
- **Anticorps monoclonaux :** par exemple Trastuzumab, Bevacizumab
- **Cytokines biosynthétique et médicaments agissant sur les cytokines :** par exemple CICLOSPORINE et Tacrolimus (immunosuppresseur); Interleukine -2 humaine recombinante ; Interférons recombinants (sclérose en plaque, traitement des hépatites) ; Erythropoïétine : traitement de l'anémie de l'insuffisante rénale chronique.

5.3. Formes galéniques des médicaments biologiques

Les médicaments biologiques sont des molécules protéiques beaucoup plus grosses et plus complexes que les médicaments chimiques classiques et à cause de ses dégradations par les enzymes digestives; ça implique qu'elles ne peuvent pas être présentées sous forme de comprimés et doivent être administrées par injection. [96]

6. Médicament biosimilaire

Un médicament biologique similaire (biosimilaire) est un médicament biologique qui fait référence à un médicament biologique ayant obtenu un AMM, dont l'équivalence avec le médicament biologique de référence a été prouvée en termes de composition en substance active, forme pharmaceutique, qualité pharmaceutique, d'innocuité et d'efficacité (essais non-cliniques et cliniques) ainsi la voie d'administration [83]

Le médicament biosimilaire n'est pas une copie parfaite du médicament biologique de référence, Les deux médicaments fonctionnent de la même manière et ont une structure très semblable [53]. (Voir tableau n°1)

Tableau 1 : différence entre un médicament générique et un biosimilaire [32] [34]

| | Médicament générique | Médicament Biosimilaires |
|--|---|---|
| Molécule | Taille et structure simples Poids moléculaire faible | Structure complexe, taille importante Poids moléculaire élevé |
| Principe actif | issu de la synthèse chimique | issu de la biotechnologie |
| Efficacité | Etude de bioéquivalence (versus médicament principes de référence) | Etude de similarité biologique et clinique (versus médicament biologique de référence) |
| Substitution par le pharmacien en ville | Autorisée | Non autorisée à ce jour |
| Facilité de caractérisation | Facilement caractérisé | Caractérisation complète difficile |
| Procédé de fabrication | Simple, prédictible, contrôlé, réactions chimiques organiques connues | Complexe, impliquant des systèmes vivants. |
| Pureté et stabilité du produit | Haute pureté et stabilité | Produit hétérogène avec de nombreuses impuretés, vulnérable aux facteurs environnementaux et impropre à la manipulation |
| Immunogénicité | Faible | Haute |

II. Aspects Règlementaires pharmaceutique

Afin d'éviter des problèmes de qualité et d'innocuité des médicaments pouvant engendrer des drames au niveau de la santé publique, les industries pharmaceutiques doivent répondre à une réglementation particulièrement drastique.

Des normes internationales ont été établies dans le but d'harmoniser, de standardiser les pratiques à travers le monde. [73]

La réglementation pharmaceutique intègre plusieurs activités complémentaires, qui se renforcent mutuellement et qui visent toutes à promouvoir et protéger la santé publique. Leur portée et leur mise en application diffèrent d'un pays à l'autre. [60]

1. Principales fonctions de la réglementation pharmaceutique [6]

- ✓ Homologuer la fabrication, l'importation, l'exportation, la distribution, la promotion et la publicité des médicaments
- ✓ Evaluer l'innocuité, l'efficacité et la qualité des médicaments et délivrer les autorisations de mise sur le marché
- ✓ Inspecter et surveiller les fabricants, importateurs, grossistes et dispensateurs de médicaments
- ✓ Contrôler et suivre la qualité des médicaments présents sur le marché
- ✓ Contrôler la promotion et la publicité des médicaments
- ✓ Surveiller les réactions indésirables aux médicaments
- ✓ Fournir aux professionnels et au public une information indépendante sur les médicaments. [6]

2. Autorités réglementaires

2.1. Autorités internationales

2.1.1. Organisation Mondiale de la Santé (OMS)

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est l'institution spécialisée des Nations Unies pour la santé. L'OMS, fondée le 7 avril 1948, a pour but d'amener tous les peuples au niveau de la santé le plus élevé possible. L'OMS est dirigée par les 192 Etats Membres réunis à l'Assemblée mondiale de la Santé. Cette assemblée est composée des délégués représentant les Etats Membres[103].

Organisation Mondiale de la Santé – OMS a publié en 2009 un guideline sur les biosimilaires intitulée « *WHO Guidelines on Evaluation of Similar Biotherapeutic Products* » afin de faciliter l'harmonisation mondiale de la réglementation des biosimilaires. [82]

2.1.2. Food and Drug Administration (FDA)

Est l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux. Créé en 1906, sous la présidence de Théodore Roosevelt, ce service du gouvernement américain, est responsable de la pharmacovigilance, c'est-à-dire des études, du contrôle et de la réglementation des médicaments après leur commercialisation.

Cet organisme a, entre autres, le mandat d'autoriser la commercialisation des médicaments sur le territoire des États-Unis. [93]

2.1.3. Conférence internationale de l'harmonisation (ICH)

Est Le Conseil international pour l'harmonisation (anciennement Conférence internationale d'harmonisation) des exigences techniques pour les produits pharmaceutiques à usage humain.

Son objectif est d'atteindre une harmonisation, le plus large possible dans le monde pour assurer la sécurité, la qualité, l'efficacité des médicaments enregistrés et de la manière la plus économique possible. [98]

Elle a été créée en 1990 par les autorités de réglementation pharmaceutique et les laboratoires pharmaceutiques de l'Union Européenne, des Etats-Unis et du Japon .Elle regroupe actuellement 17 pays.

2.1.4. Organisation internationale de normalisation (ISO)

Est une organisation internationale non gouvernementale, indépendante, dont les 164 membres sont les organismes nationaux de normalisation.

Par ses membres, l'Organisation réunit des experts qui mettent en commun leurs connaissances pour élaborer des Normes internationales d'application volontaire, fondées sur le consensus, pertinentes pour le marché, soutenant l'innovation et apportant des solutions aux enjeux mondiaux.

Notre Secrétariat central est situé à Genève, Suisse. En savoir plus sur notre structure et notre gouvernance. [97]

2.2. Autorités européennes

2.2.1. Agence Européenne des Médicaments (EMA)

Est une agence de l'Union européenne créée en 1995, elle a pour but d'évaluer, de coordonner et de superviser le développement des nouveaux médicaments à usage humain et vétérinaire dans l'union européenne. [16]

L'agence européenne des médicaments a pour but d'évaluer, de coordonner et de superviser le développement des nouveaux médicaments à usage humain et vétérinaire dans l'union européenne. [16]

L'EMA demande que le module Qualité du dossier d'AMM d'un biosimilaire soit complet et comporte en plus un exercice de comparabilité entre le médicament revendiquant le statut de biosimilaire et la référence. Par contre, les modules Non clinique et Clinique pourront être réduits et basés sur l'exercice de comparabilité seulement. [36]

2.2.2. Agence nationale de sécurité du médicament (ANSM)

L'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) a été créée par la loi du 29 décembre 2011 relative au renforcement de la sécurité sanitaire des médicaments et des produits de santé .

L'ANSM s'est substituée le 1er mai 2012 à l'Agence française de sécurité sanitaire du médicament et des produits de santé (Afssaps) dont elle a repris les missions, droits et obligations. Elle a été dotée de responsabilités et de missions nouvelles, de pouvoirs et de moyens renforcés.

Etablissement public placé sous la tutelle du ministère chargé de la santé. [87]

2.3. Autorités algériennes

2.3.1. Ministère de la santé de la Population et de la Réforme Hospitalière (MSRHP)

Le ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme hospitalière est l'administration algérienne chargée de la mise en œuvre de la politique du gouvernement dans le domaine de la santé publique. Créé en 1962, situé au niveau d'Alger centre à EL-MADANIA.

Plusieurs établissements sont sous sa tutelle, à savoir, L'Agence nationale de sécurité du médicament ; Agence nationale des produits pharmaceutiques, LNCPP, Institut pasteur d'Algérie...

2.3.2. Direction de la Pharmacie et du Médicament

Il s'agit des cadres réglementaires régissant l'utilisation, la distribution et la production des médicaments. Elle définit les fonctions et les pouvoirs en recourant à la voie législative.

La direction de la Pharmacie et du médicament est chargée entre autres aspects, du contrôle réglementaire des médicaments de l'évaluation, de l'homologation ou de l'enregistrement, de la révision, et du renouvellement de l'autorisation sur le marché, du suivi du contrôle de la qualité et de l'inspection. Elle assure par ailleurs le contrôle des normes opposables et pratiques en matière de fabrication, de l'importation, de l'exportation, de la

distribution, de l'étiquetage, de la fixation des prix des médicaments, de la diffusion de l'information, de la promotion et de la publicité.

Il lui appartient de définir les conditions d'octroi du certificat d'enregistrement et le type d'information du produit à fournir ainsi que la surveillance du contenu de l'information. [101]

2.3.3. Agence Nationale des Produits Pharmaceutiques (ANPP)

L'agence nationale des produits pharmaceutiques est une autorité administrative indépendante. Elle a été introduite dans la loi 08-13 du 20 juillet 2008 modifiant et complétant la loi 85-05 relative du 16 février 1985 à la protection et à la promotion de la santé, portant création de l'ANPP.

Ella a pour principales missions :

- Enregistrement et homologation des produits pharmaceutiques, et des dispositifs médicaux à usage de la médecine humaine ;
- Délivrance des visas pour l'importation des produits pharmaceutiques, et des dispositifs médicaux à usage de la médecine humaine ;
- Contrôler la publicité et de veiller à une information médicale fiable relative aux produits pharmaceutiques, et des dispositifs médicaux à usage de la médecine humaine. [48]

L'agence assure, notamment une mission de service public en matière d'enregistrement, d'homologation et de contrôle des produits pharmaceutiques et des dispositifs médicaux à usage de la médecine humaine.

Les missions, l'organisation et le fonctionnement de cette agence sont définis par voie réglementaire. [40]

3. Bases réglementaires

3.1. GMP européenne ou Bonnes pratiques de fabrication (BPF)

3.1.1. Les Bonnes pratiques de fabrication

Ils constituent un des éléments de l'assurance qualité qui garantit que le produit est fabriqué et contrôlé de façon cohérente et selon les normes de qualité adaptées à leur emploi.

Elles s'appliquent à la fois à la production et au contrôle qualité du produit pharmaceutique. [89]

Pour les médicaments biologiques, certaines exigences en matière de BPF ont été adaptées pour prendre en considération la nature spécifique de ces médicaments (par exemple utilisation de techniques aseptiques adéquates, réfrigération et autres conditions de stockage, stabilité, transport, etc. [54])

3.1.2. GMP européenne [10]

Le guide est scindé en trois parties : [10]

- **Partie I** présente les principes BPF applicables à la fabrication des médicaments cette partie comporte 9 chapitres dont :
 - Chapitre 6** régit le contrôle qualité, dans ce chapitre, sont décrites les bonnes pratiques de laboratoire de contrôle de la qualité.
- **Partie II** s'applique aux substances actives utilisées comme matières premières.
- **Partie III** regroupe des documents relatifs aux BPF qui clarifient certaines attentes réglementaires.

3.2. cGMP américaine

C'est en 1963 que les premiers règlements cGMP (current Good Manufacturing Practices), basés sur les directives de contrôle ont été publiés par la Food and Drug Administration.

Le guide des GMP américaines est constitué de 11 chapitres généraux, [77]

3.3. Bonnes pratiques du laboratoire (BPL)

Les Bonnes Pratiques de Laboratoire représentent le référentiel le plus ancien ; développées aux états unis en 1978 par l'agence américaine des produits alimentaire et pharmaceutique (FDA). L'organisation de coopération et développement économique (OCDE) a adopté les BPL qui sont devenues obligatoires pour les pays membres pour le contrôle des producteurs de produits chimiques et pharmaceutiques. [8]

Les principes de bonnes pratiques de laboratoire (BPL) constituent un système de garantie de la qualité du mode d'organisation et de fonctionnement des laboratoires

(dénommés "installations d'essai") qui réalisent des essais de sécurité non cliniques sur les produits chimiques [88]

La finalité des BPL est d'assurer la qualité, la reproductibilité et l'intégrité des données générées à des fins réglementaires [88]

3.4. Pharmacopées

La Pharmacopée est un ouvrage réglementaire destiné aux professionnels de santé qui définit les critères de pureté des matières premières ou des préparations entrant dans la fabrication des médicaments (à usage humain et vétérinaire) voire leur contenant, les méthodes d'analyses à utiliser pour en assurer leur contrôle.

L'ensemble des critères permettant d'assurer un contrôle de la qualité optimale est regroupé et publié sous forme de monographies.

Ces textes font autorité pour toute substance ou formule figurant dans la pharmacopée : ils constituent un référentiel opposable régulièrement mis à jour.

3.4.1. Pharmacopée Américaine (USP)

Publiée pour la première fois le 21 décembre 1820, par l'association pharmaceutique américaine, et maintenant publiée annuellement par la Convention USP, une organisation à but non lucratif qui détient la marque et les droits d'auteurs sur la pharmacopée elle-même.

L'USP est publiée dans un volume combiné avec le formulaire national sous le nom USP-NF. Les monographies de substances médicamenteuses et des produits finis sous leurs différentes formes pharmaceutiques figurent dans l'USP, tandis que les monographies des excipients sont dans le NF[104].

Dans sa version USP29-NF24 ; elle a publié une directive 1049 intitulé « qualité des produits biotechnologiques : essai de stabilité des produit biotechnologiques/ biologique Les produits biotechnologiques / biologiques ont des caractéristiques distinctives à prendre en considération dans tout programme d'essai bien défini conçu pour confirmer leur stabilité pendant la période de stockage prévue

Et que l'évaluation de la stabilité peut nécessiter des méthodologies analytiques complexes. Les tests d'activité biologique, le cas échéant, devraient faire partie des études pivots de stabilité. Des méthodes physicochimiques, biochimiques et immunochimiques

appropriées pour l'analyse de l'entité moléculaire et la détection quantitative des produits de dégradation devraient également faire partie du programme de stabilité chaque fois que la pureté et les caractéristiques moléculaires du produit permettent l'utilisation de ces méthodologies.

3.4.2. Pharmacopée Britannique (BP)

La Pharmacopée britannique est éditée par L'agence britannique pour les médicaments et produits médicaux [55].

C'est un outil de référence essentiel pour toutes les personnes et organisations impliquées dans le secteur pharmaceutique (recherche, développement, fabrication, contrôle de la qualité et analyse). La pharmacopée britannique indique les standards de qualité concernant les substances pharmaceutiques et médicaments britanniques sous forme de monographies.

La BP fournit la seule collection complète de normes officielles faisant autorité en matière de substances pharmaceutiques et de médicaments au Royaume-Uni et les pays du Commonwealth.

3.4.3. Pharmacopée Européenne

La Pharmacopée Européenne publiée par la Direction Européenne de la Qualité des Médicaments et des soins de santé (EDQM) La Pharmacopée Européenne (Ph. EUR.) est un ouvrage de référence unique en matière de contrôle qualité des médicaments.

Les normes officielles qui y sont publiées fournissent une base scientifique au contrôle de la qualité pendant le processus de développement, de production et commercialisation.

Elles concernent les essais à effectuer sur les médicaments, sur les matières premières utilisées dans leur production et sur les produits intermédiaires, ainsi que les méthodes analytiques utilisées pour leur analyse. [91]

Depuis plus de vingt ans, les monographies de la Ph. Eur. portant sur les protéines biothérapeutiques ont été élaborées selon une approche multisource donnant lieu à des normes de qualité solides pour de nombreux produits biothérapeutiques de première génération. [91]

3.5. Normes du Conseil International d'harmonisation (ICH)

Les normes ICH sont regroupées en lignes directrices qui sont organisées en 4 grands thèmes [71] :

- Qualité : ICH Q- International Conference on Harmonization Quality (12.lignes directrices)
- Sécurité : ICH S - International Conference on Harmonization Security (11 lignes directrices de S1 jusqu'à S11).
- Efficacité : ICH E- International Conference on Harmonization Efficacy (18 lignes directrices de E1 jusqu'à E18)
- Multidisciplinaire : ICH M - International Conference on Harmonization Multidisciplinary (8 lignes directrices de M1 jusqu'à M8).

Le contrôle qualité de ces produits biotechnologiques se réfère aux plusieurs lignes directrices du guideline Qualité (Q) notamment : [28][29][30]

- Q5A(R1)- Evaluation de la sécurité virale des produits biotechnologiques dérivés des lignées cellulaires d'origine humaine ou animale
- Q5B– Analyse de la construction d'expression dans les cellules utilisées pour la production de produits protéiques dérivés de l'ADN recombinant
- Q5C– Etudes de stabilité des produits biotechnologiques/biologiques
- Q5D– Dérivation et caractérisation des substrats cellulaires utilisés pour la production des produits biotechnologiques/biologiques
- Q5E– Comparabilité des produits biotechnologiques/biologiques sous réserve de modifications dans leur procédé de fabrication
- Q6B – Méthodes analytiques et critères d'acceptation pour les produits biotechnologiques/biologiques
- S6(R1) – Evaluation préclinique de la sécurité des produits pharmaceutiques issus des biotechnologies

3.6. Lignes directrices Organisation internationale de normalisation ISO

Contrairement aux lignes directrices de l'ICH, celles de l'ISO ne sont pas spécialement dédiées à l'industrie pharmaceutique. Toutes les entreprises sont susceptibles d'obtenir une certification pour une norme ISO [47]

Les lignes directrices des normes ISO sont des modèles établis par un consensus international d'experts dans le domaine. Cette expertise internationale, permet d'avoir tous les acquis de l'expérience et des bonnes pratiques établies au niveau mondial.

Dans l'industrie pharmaceutique, les certifications ISO que l'on rencontre le plus souvent sont: [47]

- ISO14001 v2015: Systèmes de management environnemental - Exigences et lignes directrices pour son utilisation.
- ISO 13485 v2016: Dispositifs médicaux - Systèmes de management de la qualité - Exigences à des fins réglementaires.
- ISO 9001 v2015: Systèmes de management de la qualité – Exigences

L'ISO 9001, est la plus connue des normes provenant de l'ISO. L'évolution du nombre de certification ISO9001, nous montre clairement que l'application de cette norme est bénéfique pour qui la met en place.

3.7. Lignes directives de l'Agence Européenne des Médicaments (EMA)

- Guideline « *Similar biological medicinal products* » :

C'est en octobre 2005 que prend effet la première guideline concernant les biosimilaires en Europe intitulée "*Similar biological medicinal products*".

L'objectif de cette guideline est d'introduire le concept de médicament biologique similaire et de définir les principes généraux à appliquer pour l'enregistrement de ces médicaments. [17]

- Guideline « *Similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance : quality issues* » :

La guideline a pour objectif d'établir les exigences en termes de qualité pour les médicaments biologiques similaires concernant l'exercice de comparabilité à un médicament biologique de référence [16]

- Ligne directrice de qualité CPMP/BWP/3207/00 :

Cette ligne directrice représente la première ligne directrice qui offre les recommandations générales relatives à la qualité des produits biologiques [50][15]

- Ligne directive de qualité CHMP/49348/05 :

Cette directive est constituée essentiellement de deux parties : une partie qui concerne la qualité des médicaments biosimilaires. L'autre partie détaille la démonstration de la comparabilité d'un médicament biosimilaire avec celle d'un produit de référence [27][94]

3.7.1. Concept de biosimilarité et exercice de comparabilité

Le concept de biosimilarité repose sur le principe de comparaison entre un produit souhaitant obtenir le statut de biosimilaire et un médicament biologique novateur, pris comme référence, approuvé par l'EMA. Le médicament biologique de référence doit déjà être commercialisé depuis plus de 8 ans dans l'Union Européenne et approuvé avec un dossier d'AMM complet (modules Qualité, Non clinique et Clinique complets).

De plus, la commercialisation d'un biosimilaire ne peut se faire avant les dix ans d'exclusivité accordés au médicament novateur de référence. La période d'exclusivité peut être allongée d'un an si le laboratoire du médicament de référence obtient une nouvelle indication importante au cours de cette période. [59]

La substance active du biosimilaire doit être similaire à celle du médicament de référence, il est également fortement recommandé que la forme pharmaceutique, le dosage et la voie d'administration soient les mêmes pour le produit biosimilaire et la référence.

3.8. Textes réglementaires algériennes

L'Algérie sera dotée d'une réglementation relative aux médicaments biosimilaires d'ici la fin de l'année en cours, selon les prévisions du ministère de la Santé.

Des médicaments biosimilaires sont, cependant, déjà commercialisés en Algérie.

Plusieurs molécules biotechnologies sont tombées dans le domaine public. Résultats, des médicaments biosimilaires font leur apparition. [6]

En Algérie, un certain nombre de biosimilaires, notamment en rhumatologie, hématologie et oncologie, sont déjà commercialisés. Et c'est bientôt les malades atteints de

diabète qui pourront bénéficier de cette nouvelle technologie avec l'entrée sur le marché des bio-similaires antidiabétiques.

L'Algérie qui est dotée d'une réglementation pour le médicament n'est, cependant, pas encore dotée d'une réglementation spécifique pour ce type de médicaments qui sont une copie conforme des médicaments issus de la biotechnologie. [6]

4. Autorisation de mise sur le marché (AMM) [72]

Document juridique établi par l'autorité de réglementation des médicaments compétents pour la mise sur le marché ou la libre distribution d'un produit dont l'innocuité, l'efficacité et la qualité ont été évaluées.

Il spécifie les informations sur lesquelles est fondée. Il contient aussi les informations approuvées à destination des professionnels de la santé et du public, le type de vente (sur ordonnance ou libre), le nom et l'adresse du titulaire de l'autorisation, et la durée de validité de l'autorisation. [72]

5. Décision d'enregistrement (DE)

La mise sur le marché d'un médicament en Algérie est conditionnée par une décision d'enregistrement dans la nomenclature nationale conformément aux articles 174, 175 et 176 de la loi N°08-13 du 20 juillet 2008 modifiant et complétant la loi du N°85-05 du 16 février 1985 relative à la protection et la promotion de la santé.

Elle est accordée par le ministre de la santé après avis de la commission nationale de nomenclature par le biais du Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques qui est considéré comme le laboratoire de référence en matière de contrôle de qualité des médicaments candidat pour une autorisation de commercialisation.

L'avis favorable issu, et la décision d'enregistrement délivrés permettent ensuite la libération de chaque lot produit.

6. Assurance Qualité (AQ)

Est un ensemble des actions préétablies et systématiques nécessaires pour donner la confiance appropriée en ce qu'un produit ou service satisfera aux exigences données relatives à la qualité".

L'esprit de l'assurance qualité s'appuie sur des règles simples de bons sens qui n'ont pas un caractère novateur si on les considère séparément, mais qui constituent un "système" cohérent lorsqu'elles sont réunies dans un code ou un programme général[47]

7. Contrôle de la qualité (CQ)

Toutes les mesures prises, à savoir la définition des spécifications, l'échantillonnage, les tests de contrôle analytique, pour faire en sorte que les matières premières, les produits intermédiaires, les matériaux de conditionnement et les produits pharmaceutiques finis soient conformes aux spécifications fixées pour l'identification, le dosage, la pureté et d'autres caractéristiques. [68]

CHPITRE II
CONTROLE DE LA QUALITE DES
MEDICAMENTS BIOLOGIQUES ET
BIOSIMILAIRE

La substance active biologique contient la substance désirée mais aussi des isoformes et des variantes de structure proche non éliminés lors de la purification, pouvant être dotés également d'une activité biologique équivalente ou proche au produit désiré. Elle contient également des impuretés de dégradation qui sont liées au produit et des impuretés liées au procédé de fabrication.

La substance active biologique est soumise à des variabilités suivant le mode de production utilisé qui apporte des différences en termes de profil de pureté et d'impuretés d'un médicament biologique (ou biosimilaire). Du fait de la production dans des systèmes vivants et selon la nature de la cellule hôte utilisée, la substance active subit des réactions biochimiques différentes.

Le contrôle de la qualité des produits biologiques est un exercice difficile, qui peut être résumé dans les essais suivants :

1. Caractérisation de la substance active

La caractérisation complète de la protéine recombinante est principalement effectuée lors du développement d'un nouveau biomédicament mais aussi lors du développement d'un biosimilaire à une référence choisie pour la soumettre à comparaison auprès des autorités compétentes. [12]

La caractérisation permet également de confirmer la qualité du produit lors d'un changement dans le procédé de fabrication et de déterminer les spécifications employées pour la libération des produits en routine. [81]

Les propriétés physicochimiques, l'activité biologique, les propriétés immunochimiques et le profil de pureté/impuretés font partis des caractéristiques à étudier de manière approfondie afin de garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament.

1.1. Caractéristiques physicochimiques

Les principales caractéristiques physicochimiques analysées sont la séquence peptidique, le poids moléculaire, la conformation spatiale et les éventuelles modifications post-traductionnelles. D'autres spécificités peuvent être évaluées comme la charge, le point isoélectrique ou l'hydrophobicité de la protéine par exemple.

La séquence peptidique ou structure primaire est obtenue grâce à l'identification des fragments peptidiques par des méthodes de spectrométrie de masse ou par des méthodes de fragmentation enzymatique/chimique de la protéine suivie d'une analyse par chromatographie HPLC. Il peut être nécessaire de coupler diverses méthodes pour obtenir une analyse détaillée du fait de la complexité moléculaire de la protéine recombinante. [81]

L'activité biologique décrit la capacité d'un produit à réaliser un effet biologique déterminé. Elle est quantifiée au travers de la mesure de la puissance sur la base d'un attribut du produit lié à des propriétés biologiques pertinentes et s'exprime par exemple en Unité Internationale (UI) [81]

1.2. Pureté, impuretés et contaminant

Le profil de pureté et d'impuretés d'un médicament biologique est complexe. En effet, il existe de nombreux variant qui sont dépourvus d'activité biologique et donc considérés comme des impuretés, associés à des impuretés de dégradation et à des impuretés liées au procédé de fabrication.

1.3. Impuretés liées au produit

Les impuretés liées au produit peuvent apparaître lors de la production mais aussi lors de la conservation de la substance active, il s'agit des impuretés de dégradation.

1.4. Impuretés et contaminants liés au procédé de fabrication

Les impuretés liées au procédé de fabrication peuvent provenir des substrats cellulaires ainsi que du procédé de culture cellulaire, d'extraction et de purification. Il est possible de retrouver également des contaminants dans le produit tels que des virus exogènes et "*adventices*" qui ont été introduits de manière non intentionnelle lors de la fabrication [81]

Il est important d'évaluer ces impuretés, en s'aidant de la combinaison de plusieurs méthodes analytiques, pour définir des normes d'acceptation lors des contrôles en vue de la commercialisation du produit.

2. Contrôle de routine

Le contrôle de routine ne reprend pas toutes les études effectuées lors de la caractérisation, il s'agit en fait d'une sélection de tests appropriés qui permettront de confirmer la qualité de la substance active et du produit fini en vue de la commercialisation. Les tests retenus dépendront de la substance active et de la forme pharmaceutique utilisée.

- L'USP fixe des normes d'identification lors des analyses de contrôle qualité des produits biologiques injectables ; dont la molécule étudiée dans notre mémoire fait partie :
 - **Identification de la substance active:** Le temps de rétention du pic de la substance active dans le chromatogramme de la préparation de test correspond au temps de rétention des espèces appropriées dans le chromatogramme de la préparation d'identification, tel qu'obtenu dans la solution test.
 - **Stérilité**
 - **pH**
 - **Matière particulaires**
 - **Limite des protéines des haut poids moléculaire**

Le Tableau (n°2) ci-dessous résume les principaux contrôles physicochimiques et microbiologiques à effectuer pour la libération du produit fini.

Tableau 2 : Contrôle de routine les plus fréquents des produits biologiques [51][63]

| Attributs | Critère | Méthode | Produit fini |
|--|--------------------------------|-----------------------------------|--------------|
| Général | Apparence | Monographie | Oui |
| | Volume | Pharmacopée | Oui |
| | pH | | Oui |
| | Osmolalité | | Oui |
| | Particules visibles | | Oui |
| Identité | Structure | Cartographie peptidique | Non |
| | Taille | SDS-PAGE, HP-SEC | Oui |
| | Charge | IEC, HIC, IEF, CZE | Oui |
| Identification de la substance active | temps de rétention du pic | SR-HPLC | Oui |
| PH | | Potentiométrie | Oui |
| Limite des HMWP | Temps de rétention pourcentage | SE-HPLC | Oui |
| Pureté/ Impuretés | Protéines cellule hôte | ELISA ;Q-PCR | Non |
| | ADN résiduel | SDS-PAGE, SEC-UV, CGE, IEF, HPLC, | Non |
| | Variants | HPAC | Non |
| | autres | HPLC | Oui |
| | | | |
| Contaminants | Endotoxines | Monographies | Oui |
| | Charge microbienne | Pharmacopée | Non |
| | Stérilité | | Oui |
| Puissance | Activité biologique | Liaison au récepteur | Oui |
| Dosage | Concentration | HPLC, Absorbance A280 | Oui |

CHAPITRE III
PRESENTATION DE LA MOLECULE
Liraglutide 6mg/mL

I. GENERALITE SUR LE DIABETE.

1. Définition du diabète

Le diabète est une maladie chronique définie comme une affection métabolique qui apparait lorsque le pancréas ne produit plus suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise plus correctement celle qu'il produit. Il en résulte une concentration accrue de glucose dans le sang. La déficience sécrétoire et les anomalies de l'action de l'insuline sur les tissus cibles (muscles et tissu adipeux) peuvent être associées.

L'insuline est une hormone qui régule la concentration de sucre dans le sang, son action est hypoglycémiante et lors du diabète, une hyperglycémie chronique s'installe laquelle va conduire avec le temps à une atteinte grave de nombreux systèmes organiques et plus particulièrement des nerfs et des vaisseaux sanguins à l'origine des complications cliniques du diabète. [58]

2. Types de diabète

Le Diabète de type 1

Est une maladie auto-immune (anciennement connu sous le nom de diabète insulino-dépendant ou juvénile) caractérisé par une carence totale de la production d'insuline et exigeant une administration quotidienne de cette dernière. Les causes exactes de son apparition ne sont pas connues ; dans la plupart des cas les cellules bêta du pancréas sont détruites par le système immunitaire. Les symptômes sont fatigue, syndrome polyurie-polydypsique, amaigrissement.

Le diabète de type 2

Est caractérisé par l'association d'une insulino-résistance et d'une insulino-pénie (anciennement dénommé diabète non insulino-dépendant ou diabète de la maturité) résulte lui d'un défaut de l'action physiologique de l'insuline, qui va conduire après plusieurs années d'évolution à une insulino-pénie progressive et inéluctable. Il est en grande partie le résultat d'une surcharge pondérale et de la sédentarité (80% des patients atteints sont en surpoids ou obèses) [26]. Cette forme de diabète touche surtout les individus de plus de 50 ans toutefois.

Les diabètes dits de type MODY (MATURITY ONSET DIABETES OF THE YOUNG)

Ils regroupent des diabètes hétérogènes ou la dysfonction de la sécrétion d'insuline provient d'anomalies génétiques et qui apparaissent avant l'âge de 25 ans.

Le diabète gestationnel

Il correspond à une situation d'hyperglycémie rencontrée pendant la grossesse, mais à des valeurs inférieures à celles conduisant à poser le diagnostic de diabète. Les femmes atteintes de diabète gestationnel ont un risque accru de complications pendant la grossesse et à l'accouchement. Leur risque ainsi que celui de leur enfant, d'avoir un diabète de type 2 à un stade ultérieur de leur vie augmente également. Il est souvent diagnostiqué au cours du dépistage prénatal et non pas en raison de la survenue de symptômes.

Les caractéristiques cliniques des diabètes type 1 et type 2 sont représentés dans le tableau n°3 suivant :

Tableau 3 : Caractéristiques cliniques des diabètes de type 1 et 2.

| | Diabète de type I | Diabète de type II |
|--|---|---|
| Age du diagnostic | Enfance et adolescence | Adulte |
| Prévalence | 10% | 90% |
| Début | Rapide, aigu | Variable, souvent Insidieux |
| Acidocétose | Fréquente | Rare |
| Obésité | Non | Fréquente |
| Caractère familial % de parents avec un diabète | 2-4 % | 80% |
| Insulinosécrétion | Très basse | Variable |
| Insulinosensibilité | Normale | Diminué |
| Insulinothérapie | Indispensable | 20% des cas |
| ADO | Inefficace | Efficace |
| Complications chroniques | .Pas avant 5 ans d'évolution Complications à prédominance micro-angiopathiques | Déjà présente dans 30 % des cas au moment du Dg Complications à prédominance macro-angiopathique |

3. Diagnostic du diabète sucré

L'OMS indique que le critère diagnostique biologique du diabète peut être retenu devant : [80]

- Soit la présence de symptômes de diabète (polyurie, polydipsie, amaigrissement) associée à une glycémie (sur plasma veineux) $\geq 2\text{g/l}$ (11,1mmol/l)
- Soit une glycémie (sur plasma veineux) après un jeûne de 8 heures $\geq 1,26\text{g/l}$ (7mmol/l) et ceci après une vérification à 2 reprises.
- Soit une glycémie (sur plasma veineux) 2 heures après ingestion de 75 grammes de glucose [test d'hyperglycémie provoquée orale (HGPO)] $\geq 2\text{g/l}$ (11,1mmol/l).

Il faut préciser qu'il n'est actuellement plus recommandé d'utiliser l'HGPO (difficile à mettre en œuvre et peu fiable dans les résultats) ; seule la glycémie à jeun est pratiquée habituellement.

4. Traitements du diabète.

A côté des traitements pharmacologiques, Le traitement du diabète impose d'avoir un régime alimentaire sain et de pratiquer une activité physique ainsi que de réduire la glycémie et les autres facteurs de risque de lésion des vaisseaux sanguins. [25]

4.1. Traitement du diabète de type I

Le traitement du diabète de type 1 repose sur des injections sous-cutanées d'insuline plusieurs fois par jour, pour compenser son défaut de production par l'organisme. On utilise aujourd'hui des analogues d'insuline humaine, produits par des bactéries génétiquement modifiées (voir annexe n°1).

Le traitement initial par insuline nécessite de fréquents réajustements des doses en tenant compte des variations de l'alimentation et de l'activité physique. [25]

4.2. Traitement du diabète de type II

4.2.1. Les Insulino-sensibilisateurs

4.2.1.1. Les Biguanides.

Le seul représentant de cette classe est la metformine ; son mode d'action n'est pas encore totalement élucidé.

La metformine est l'une des plus anciennes molécules parmi les antidiabétiques oraux (ADO). Son effet sur la glycémie résulte de la diminution de la production hépatique de glucose et de l'augmentation du transport de glucose dans les cellules musculaires. Elle améliore aussi le profil lipidique et la stéatose hépatique. [85]

4.2.2. Les Insulino-sécrétagogues.

4.2.2.1. Les Sulfonylurées.

Il s'agit des sulfamides hypoglycémisants qui sont les plus anciens ADO utilisés dans le traitement du DT2 (depuis les années cinquante). Il existe dans cette famille de médicaments plusieurs molécules qui se différencient par leur demi-vie biologique et leur durée d'action (de par la présence de métabolites actifs ou non); Les plus utilisés sont le glibenclamide, le gliclazide et le glimépiride.

Leur efficacité est rapide mais l'effet pharmacologique s'épuise au fil du temps. [66]

4.2.2.2. Les Glinides.

Il s'agit d'une classe thérapeutique dont la structure chimique est proche de celle des sulfamides et leur mode d'action au niveau de la stimulation de la sécrétion d'insuline par le pancréas est similaire aux sulfamides, ils se distinguent des sulfamides par leur action rapide et de courte durée.

Ces caractéristiques les rendent intéressants pour le contrôle de la glycémie postprandiale, diminuant en même temps le risque d'hypoglycémie. Leur efficacité sur la glycémie est comparable à celle des sulfamides.

Les deux représentants de cette classe de médicaments sont le Répaglinide et le Natéglinide. [66]

4.2.3. Les incretino-mimétiques et les incretino-modulateurs

Les nouvelles approches disponibles se basent sur le concept incrétine et utilisent comme cible le glucagon-like peptide -1 (GLP-1). Cette hormone intestinale potentialise la sécrétion insulinaire en réponse au repas, mais exerce aussi diverses actions intéressantes pour la prise en charge du patient diabétique de type 2 [67]

L'effet incrétine » est diminué au cours du diabète de type 2, alors que, chez le sujet non diabétique, environ 60 % de la sécrétion d'insuline, après un repas, est liée à l'effet « incrétines ».

L'administration de GLP-1 chez un sujet DT2, induit une augmentation de la réponse insulinosécrétoire similaire à celle observée chez des sujets témoins [23]. Ainsi, deux approches thérapeutiques ont été développées :

- Les analogues du GLP-1 (GLP-1 receptor agonist), ils ont été modifiés par rapport au GLP1 humain pour résister à la dégradation par l'enzyme DPP-4 Ils sont actifs plus longtemps et miment l'action physiologique du GLP1 endogène ; c'est la classe thérapeutique à laquelle appartient notre molécule à étudier dans ce travail.
- Les inhibiteurs de la DPP-4 (DPP4 inhibitor) qui préviennent la dégradation du GLP-17-36 et prolongent ainsi la durée de vie du GLP-1 actif.

4.2.3.1. Les Analogues du GLP1

4.2.3.1.1. L'exantide

L'exénatide est un peptide synthétique analogue de l'exendine-4. L'exendine-4 présente 50% d'homologie de séquence avec le GLP-1 humain, mais présente le bénéfice d'être résistant à l'action de l'enzyme DPP-IV.

Les avantages par rapport à l'insuline consistent en une absence de prise de poids (au contraire, un amaigrissement est généralement observé) et en la non-nécessité de recourir à une titration posologique basée sur une auto-surveillance glycémique régulière. Le risque hypoglycémique avec l'exénatide est également très faible.

Les inconvénients consistent parfois en une intolérance locale au site d'injection sous-cutané abdominal (rougeur, prurit) et en nausées, surtout en début de traitement. [3]

4.2.3.1.2. Le Liraglutide

Le liraglutide est un peptide analogue au glucagon-1 humain (GLP-1) produit par la technique de l'ADN recombinant sur *Saccharomyces cerevisiae*. Il présente 97 % d'homologie avec le GLP-1 humain et active le récepteur du GLP-1.

Le liraglutide diffère de l'exénatide par sa plus forte homologie avec le GLP-1 humain (97% versus 53% pour l'exénatide), ce qui entraîne une moindre production d'anticorps (de l'ordre de 10% versus 50%). Il se distingue également par sa demi-vie plus longue (13 heures versus 2,4 heures), ce qui permet une seule injection sous-cutanée quotidienne au lieu de 2 avec l'exénatide.

Le liraglutide doit être administré une fois par jour, quel que soit le moment de la journée, indépendamment des repas. Il peut être injecté par voie sous-cutanée dans l'abdomen, la cuisse ou le haut du bras. [4]

Cette molécule fait l'objet de notre étude.

4.2.3.2. Les Inhibiteurs de la DPP4 ou Gliptines

La dipeptidyl peptidase IV est une glycoprotéine ubiquitaire composée de 776 acides aminés qui se retrouve à la fois sous forme circulante dans le plasma (catalytiquement active) et en position transmembranaire. Elle est exprimée dans de nombreux tissus : les reins, le foie le tube digestif (la bordure en brosse des enterocytes de l'intestin), les lymphocytes et dans l'endothélium vasculaire (notamment des capillaires adjacents aux cellules L de l'intestin).

Les inhibiteurs de la DPP-IV ont pour principe de prolonger l'action physiologique du GLP1 endogène en empêchant la dégradation de celui-ci. Ils offrent l'avantage de pouvoir être utilisés par voie orale. Les molécules commercialisées sont la sitagliptine et la vildagliptine. Beaucoup d'autres sont en cours de développement, ce qui témoigne de l'engouement de l'industrie pharmaceutique pour cette nouvelle approche thérapeutique.

Les inhibiteurs de la DPP-IV ne s'accompagnent cependant pas d'une perte pondérale notable, contrairement à ce qui est observé avec l'exénatide ou avec le liraglutide. Ils ont l'avantage d'une utilisation très simple, avec une prise orale unique par jour, ainsi que d'une excellente tolérance subjective et objective. [20]

4.2.4. L'insulinothérapie

La mise en route de l'insulinothérapie dans le diabète de type 2 est initiée après l'échec des ADO (voir annexe n°2). Les insulines utilisées sont les mêmes que celles pour le diabète type 1 (voir annexe n°1).

II. PRESENTATION DU LIRAGLUTIDE

Le médicament étudié est un produit biologique à base de LIRAGLUTIDE. Leur précurseur peptidique ; il a été produit au moyen d'un procédé comprenant l'expression de l'ADN recombiné dans *Saccharomyces cerevisiae*. [57]

LIRAGLUTIDE est un médicament utilisé avec un régime alimentaire et de l'exercice pour aider à gérer le poids des adultes. Il est semblable à une hormone naturelle appelée glucagon-like peptide-1 (GLP-1). [92]

Ce médicament est un antidiabétique appartient à la classe de la classe des incréto-mimétiques, administré par voie sous-cutanée. [92]

1. Aspect et présentation du LIRAGLUTIDE

Le médicament se présente comme une solution injectable incolore ou presque incolore et limpide dans un stylo prérempli. Chaque stylo contient 3 ml de solution. Voir figure n°2 et 3



Figure 2 : la forme extérieure de stylo pré-rempli de la solution injectable à base de LIRAGLUTIDE 6 mg/mL



Figure 3: Représentation de forme extérieure d'un Stylo prérempli

1.1. Composition

1.1.1. Substance active

Il s'agit de Liraglutide dont 1 ml contient 6 mg de liraglutide (6mg/mL)

Un stylo prérempli contient 18 mg de liraglutide (3mL) [92]

1.1.1.1. Formule brute de molécule active



1.1.1.2. Formule développée

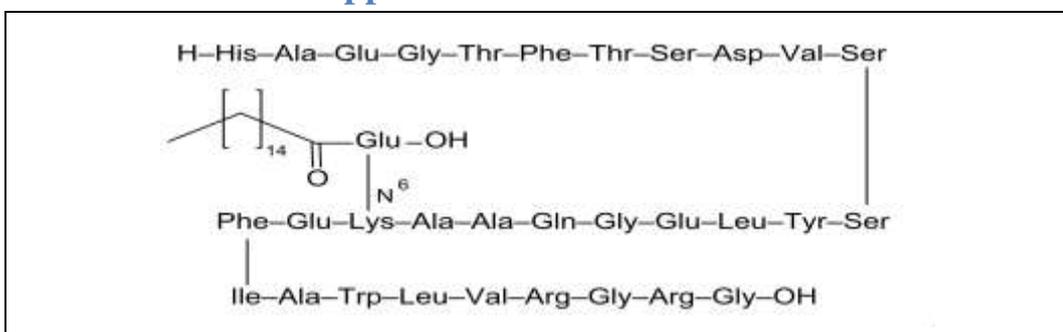


Figure 4 : Forme développée de liraglutide

1.1.1.3. Liste des excipients

Excipients : [57]

- Phosphate disodique dihydraté
- Propylène glycol
- **Phénol**
- Acide chlorhydrique (pour ajustement du pH)
- Hydroxyde de sodium (pour ajustement du pH)
- Eau pour préparations injectables

1.1.1.4. L'intérêt d'utilisation de phénol comme excipient dans la solution

Selon l'USP dans sa version 25 Le phénol est largement utilisé comme : Agent désinfectants ; antiseptique; antioxydants et antimicrobien .Il rentre aussi comme excipient dans la formulation de plusieurs spécialités pharmaceutiques surtout dans les préparations injectables dont le principe actif est une molécule de nature peptidique.

Il est utilisé avec le Liraglutide pour ses deux propriétés :

- **Pouvoir antimicrobien**

C'est un agent de conservation, présentant une activité antimicrobienne contre un large spectre de microorganismes tels que les bactéries Gram négatif et Gram positif, les mycobactéries et certains champignons.

- **Pouvoir stabilisant**

Il sert à contrebalancer les réactions de désamination et la formation de protéines de haut poids moléculaire (**HMWP**) induites par l'utilisation du glycérol comme un agent isotonique.

Bien qu'efficace, le phénol peut être nocif à certaines concentrations .Il y a donc un compromis à trouver pour atteindre le bon équilibre en termes de quantité à introduire.

1.2. Propriétés physicochimique de LIRAGLUTIDE

- Solution isotonique;
- pH = 8,15.
- Masse relative $3\,751,202 \pm 0,1801$ g/mol C 55,07 %, H 7,12 %, N 16,06 %, O 21,75 %,
- Polaire [92]

1.3. Données pharmacologiques

1.3.1. Mécanisme d'action (pharmacodynamie)

Le liraglutide est un analogue du glucagon-like peptide-1 (GLP-1) humain acylé, dont la séquence d'acides aminés présente 97 % d'homologie avec le GLP-1 humain endogène. Le liraglutide se lie au récepteur du GLP-1 (GLP-1R) et l'active.

Le GLP-1 agit par l'intermédiaire d'un récepteur exprimé au niveau des cellules à insuline (β) et de certains tissus périphériques comme le système nerveux central et périphérique, le cœur, les reins, les poumons et le tractus digestif.^{1,5} L'activation des récepteurs par le GLP-1 stimule la sécrétion d'insuline mais aussi active la transcription du gène de l'insuline, augmente la biosynthèse d'insuline, stimule la prolifération et la survie des cellules et diminue la mort cellulaire. Enfin, le GLP-1 inhibe la sécrétion de glucagon, ralentit la vidange gastrique et augmente le sentiment de satiété chez les diabétique type 2.

Le liraglutide est un agent de l'incrétine classe de médicaments mimétiques qui est une combinaison analogique acylé GLP-1. Lors des études effectuées chez l'animal, l'administration périphérique de liraglutide a entraîné une assimilation dans des régions cérébrales spécifiques impliquées dans la régulation de l'appétit. Le liraglutide, par l'activation spécifique du GLP-1R, a ainsi augmenté la satiété et diminué les principaux signaux de la faim, ce qui a entraîné une perte de poids.[102]

1.3.2. Effets pharmacodynamiques

Le liraglutide a une durée d'action de 24 heures. Il améliore le contrôle glycémique des patients diabétiques de type 2 en diminuant la glycémie à jeun et la glycémie postprandiale.

Le liraglutide stimule la sécrétion d'insuline et réduit la sécrétion de glucagon de façon glucose-dépendante, ce qui abaisse la glycémie à jeun et la glycémie postprandiale. L'effet hypoglycémiant est plus prononcé chez les patients présentant un prédiabète et un diabète comparativement aux patients ayant une glycémie normale. Des essais cliniques suggèrent que le liraglutide améliore et prolonge la fonction bêta-cellulaire, selon le modèle HOMA-B et le rapport pro-insuline/insuline. [102]

1.4. Indications thérapeutiques

LIRAGLUTIDE est indiqué chez les adultes pour le traitement du diabète type 2 insuffisamment contrôlé:

- en monothérapie, quand l'utilisation de la metformine est considérée comme inappropriée en raison d'une intolérance ou d'une contre-indication
- en association avec d'autres médicaments destinés au traitement du diabète.
- en complément d'un régime hypocalorique et d'une augmentation de l'activité physique dans le contrôle du poids chez des patients adultes ayant un Indice de Masse Corporelle (IMC) initial ($\geq 30 \text{ kg/m}^2$ (obésité), Ou : $\geq 27 \text{ kg/m}^2$ et $< 30 \text{ kg/m}^2$ (surpoids) en présence d'au moins un facteur de comorbidité lié au poids tel qu'une dysglycémie (prédiabète ou diabète de type 2), une hypertension artérielle, une dyslipidémie ou un syndrome d'apnée obstructive du sommeil. [57]

1.5. Contre-indications

- Hypersensibilité liraglutide
- Diabète de type 1
- Acidocétose diabétique
- Grossesse
- Allaitement
- Enfant en dessous de 18 ans
- Insuffisance cardiaque de classe NYHA IV
- Maladie inflammatoire de l'intestin
- Gastroparésie diabétique
- Insuffisance rénale au stade terminal
- Insuffisance hépatique sévère[57]

1.6. Effets indésirables [57]

- Etourdissements;
- Maux de tête;
- une rougeur, une démangeaison ou une enflure au lieu d'injection;

- Troubles cardiaques : tachycardie
- Troubles gastro-intestinaux : pancréatite ; Constipation ; diarrhée ; brûlures d'estomac ; la nausée, des vomissements.
- Troubles hépatobiliaires : cholécystite
- Troubles du système immunitaire : réaction anaphylactique
- Troubles du métabolisme et de la nutrition : déshydratation
- Troubles rénaux et urinaires : insuffisance rénale aiguë, insuffisance rénale
- Troubles de la peau et des tissus sous-cutanés : urticaire[57]

1.7. Interactions

Interactions médicament-médicament

Liraglutide est très peu susceptible de causer des interactions pharmacocinétiques médicament-médicament liées au cytochrome P450 ou à la fixation aux protéines plasmatiques.

Interactions médicament-aliment Il n'existe aucune interaction connue avec un aliment.

Interactions médicament-herbe médicinale Aucune interaction avec des produits à base d'herbes médicinales n'a été établie.

Interactions médicament-examen de laboratoire Il n'existe aucune interaction connue avec un examen de laboratoire.

Interactions médicament-mode de vie Il n'existe aucune interaction connue avec le mode de vie. [57]

CHAPITRE IV

METHODE D'ANALYSE UTILISEE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

La chromatographie est une méthode d'analyse physico-chimique qui sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une phase mobile liquide le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile) [86]

Les molécules passant continuellement d'une phase à l'autre; ce qui crée un état d'équilibre entre la phase mobile et la phase stationnaire pour un constituant en particulier. Cet équilibre est représenté par le coefficient de partage K [9][11]

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

- C_s = concentration dans la phase stationnaire
- C_m = concentration dans la phase mobile mobile [11]

1. Chromatographie liquide

Les méthodes chromatographiques liquides sont classées d'après la nature des phases utilisées ou celle des phénomènes mis en œuvre dans la séparation ou la technologie mise en œuvre, comme le montre la figure n°5 ci-dessous [11][41][52].

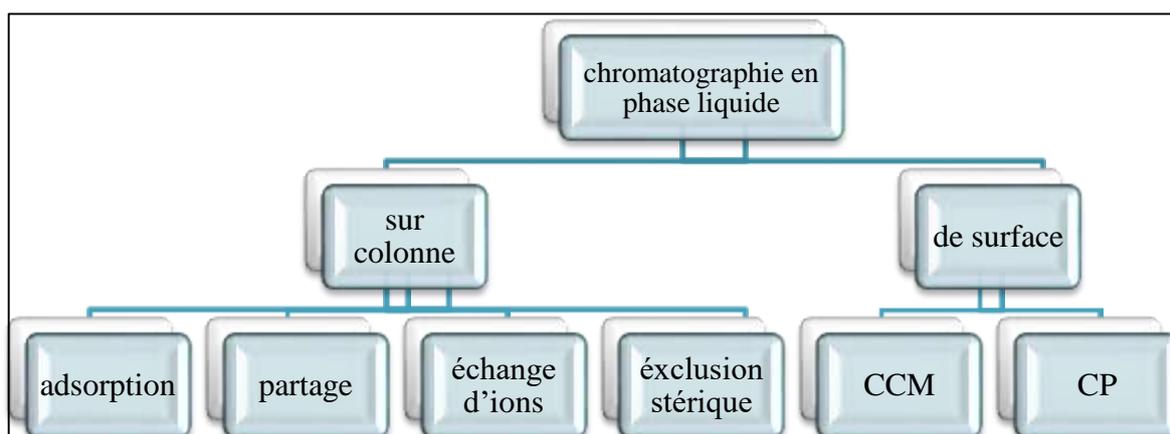


Figure 5: Classification des méthodes de chromatographies liquides

1.1. Chromatographie liquide à haute performance

1.1.1. Principe

Les composés à séparer sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire de fine granulométrie dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression (une pression élevée de l'ordre de 100 bars), parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les solutés se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. Il en résulte le déplacement des composés à différentes vitesses et c'est le détecteur placé à la sortie de la colonne, couplé à un enregistreur qui permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme

En effet, il dirige sur un enregistreur un signal constant appelé ligne de base en présence de la phase mobile seule, par la suite; au passage de chaque soluté séparé il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic [13]

1.1.2. Intérêt de la HPLC dans le contrôle qualité en industrie pharmaceutique [43]

Dans l'industrie pharmaceutique moderne, la HPLC est l'outil majeur et partie intégrante d'analyse appliquée aux différentes phases du cycle de vie d'un médicament chimique ou biologique (découverte, développement et mise sur le marché). La HPLC occupe une place indétrônable dans le contrôle qualité des produits pharmaceutiques grâce aux nombreux intérêts qu'elle offre : [43]

- Evaluation de l'uniformité de la dose et de la stabilité de la préparation lors du stockage ;
- Examiner la pureté et la qualité des préparations pharmaceutiques en particulier dans le cas où la chromatographie en phase gazeuse (CPG) est inappropriée en raison de sa stabilité thermique insuffisante ou de la faible volatilité des composants ;
- Estimation précise de la composition qualitative et quantitative des produits pharmaceutiques multi composant (principes actifs, impuretés, excipient, agents stabilisants, agents conservateurs) ;
- Dosage et l'identification des liquides biologiques et des tissus ainsi que dans l'étude de leurs voies métaboliques et leur pharmacocinétique ;

La grande sélectivité de la méthode permet le dosage des impuretés, des isomères et les produits de dégradation des produits pharmaceutiques.

1.1.3. Appareillage [42]

Un appareil d'HPLC comprend différents modules : un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluions graduées, un injecteur, une colonne, un détecteur et un système d'acquisition de données(ou d'un intégrateur ou enregistreur), la figure n° 6ci-dessous comporte les différentes composantes d'une chaine HPLC [42]

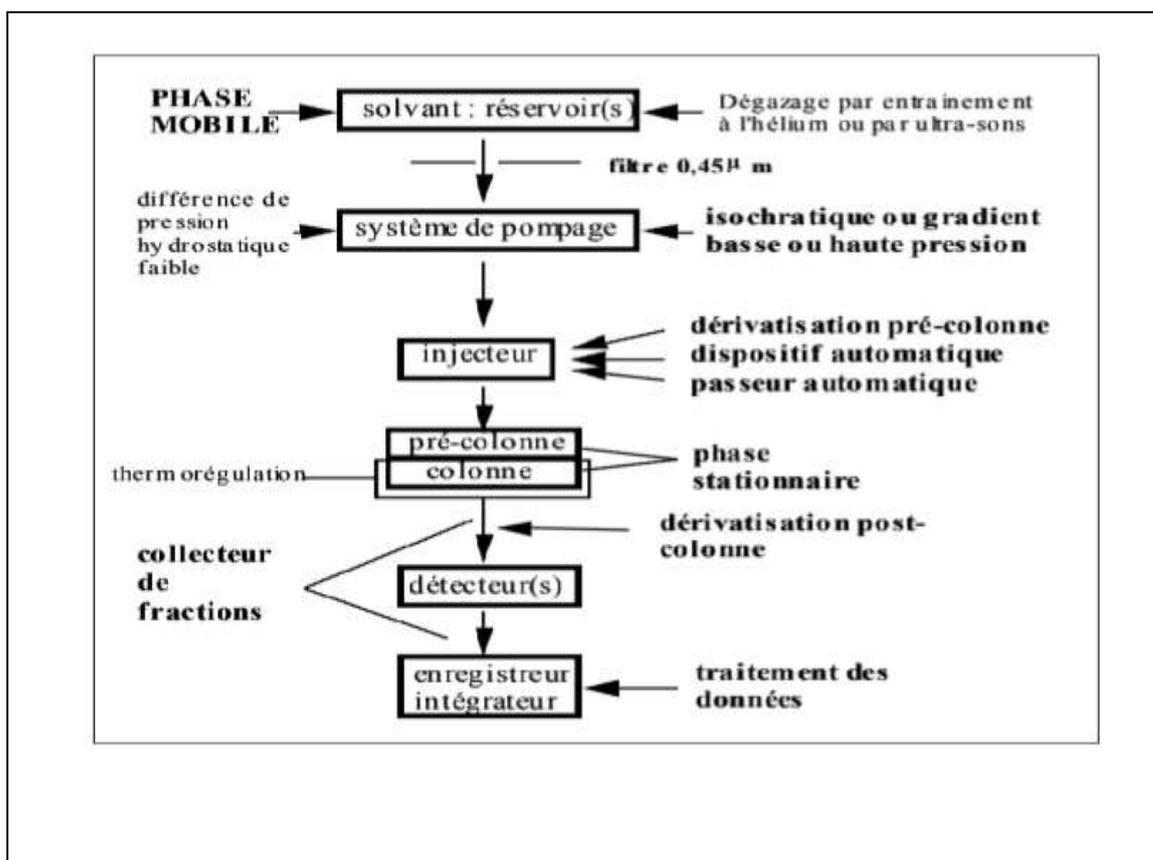


Figure 6 : Schéma d'un système HPLC.

1.1.4.1. Système de pompage

Les systèmes de pompage pour HPLC doivent fournir la phase mobile à un débit constant. Il convient de limiter autant que possible les fluctuations de pression, en faisant passer le solvant sous pression à travers un dispositif amortissant les pulsations. Les tubes et raccords doivent pouvoir résister aux pressions développées par la pompe. Les pompes pour HPLC peuvent être équipées d'un dispositif de purge qui permet de chasser les bulles d'air emprisonnées.

Les systèmes pilotés par microprocesseur sont capables de délivrer avec précision une phase mobile de composition constante (élution isocratique) ou variable (gradient d'élution), selon un programme défini. Pour les chromatographies à gradient d'élution; il existe des systèmes de pompage qui délivrent le(s) solvant(s) à partir de plusieurs réservoirs [43]

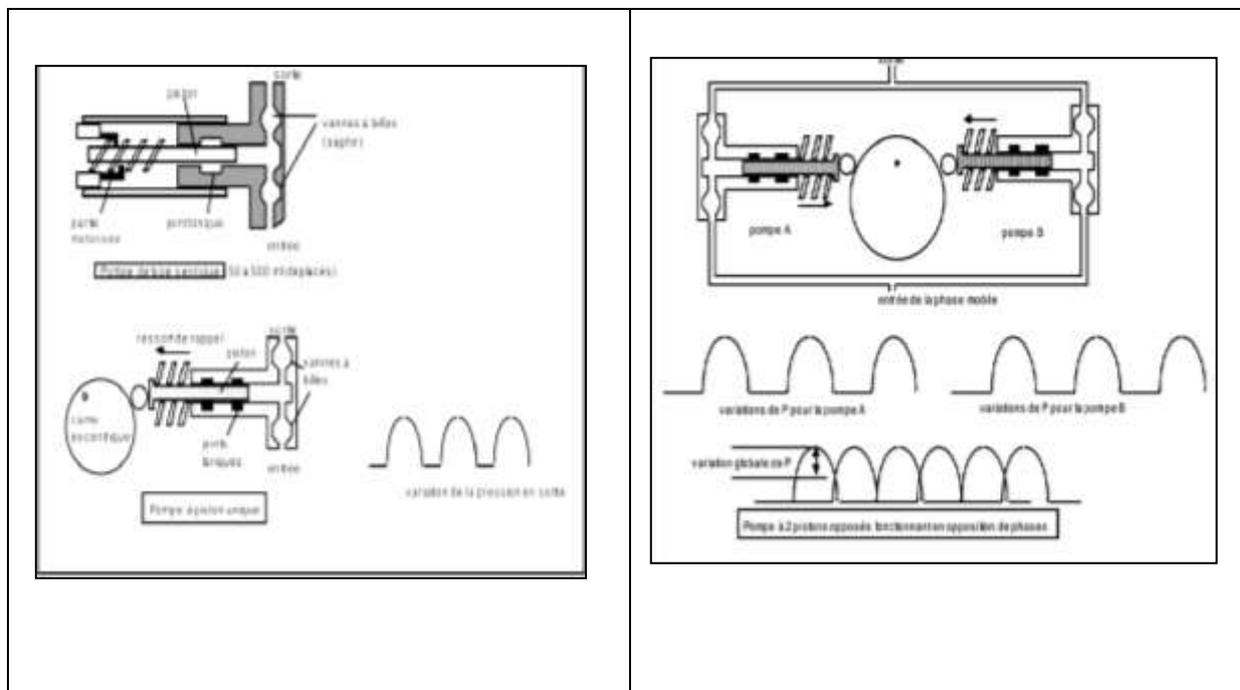


Figure 7 : Schémas de quelques pompes utilisées en HPLC

1.1.4.2.Phase mobile

Les composants de la phase mobile sont généralement filtrés pour éliminer les particules de la taille supérieure à $0,45 \mu\text{m}$. Les phases mobiles à plusieurs composants sont préparées par mesure de volumes requis pour chaque composant, puis par mélange des différents composants. [76]

Les solvants sont normalement dégazés avant le pompage, par passage d'un courant d'hélium, sonification ou traitement en ligne par des modules membranes/vide, pour éviter la formation de bulles de gaz dans la cellule de détection. [76]

Les solvants utilisés pour préparer la phase mobile sont normalement exempts d'agents stabilisants, et transparents à la longueur d'onde de détection, non corrosive et de faible viscosité, et de qualité HPLC. [19]

Si des solutions tampons sont utilisées, il convient de rincer soigneusement le système avec un mélange d'eau et du modifiant organique de la phase mobile une fois la chromatographie terminée, afin d'éviter la cristallisation des sels. [49][76]

On distingue deux types d'élution :

- **Elution en mode isocratique**

Dans ce type d'élution, la composition de la phase mobile reste constante tout au long de l'analyse chromatographique. Ce type d'élution est applicable à des analytes dont les valeurs de k (coefficient de partage) ne sont pas trop différentes [33]

- **Elution en mode gradient**

Le mode gradient permet l'élution de composés dont les k sont très différents ou au contraire de composés dont les k sont très voisins. Si tous ces composés sont présents dans l'échantillon à analyser, il est clair qu'il faudra faire varier dans le temps le pourcentage en solvant de façon différente tout au long de l'analyse, d'où la nécessité d'utiliser un système d'élution à gradient

Les appareils modernes proposent des systèmes gérés par microordinateurs qui permettent de réaliser des gradients par mélange de deux solvants, ou mélange ternaire voire quaternaire. [33]

1.1.4.3.Injecteurs

La solution à examiner est introduite dans la phase mobile circulante en tête de colonne, ou à proximité de celle-ci, à l'aide d'un système d'injection conçu pour fonctionner à pression élevée. L'injection doit se faire de manière très rapide afin de perturber le moins longtemps possible le régime de circulation du solvant. On doit injecter rapidement un volume précis sans arrêter l'écoulement du solvant à un endroit où règne une pression élevée.

Actuellement, les injecteurs peuvent être à boucle d'échantillonnage fixe ou à volume variable, à fonctionnement pilotés par un échantillonneur automatique [65]

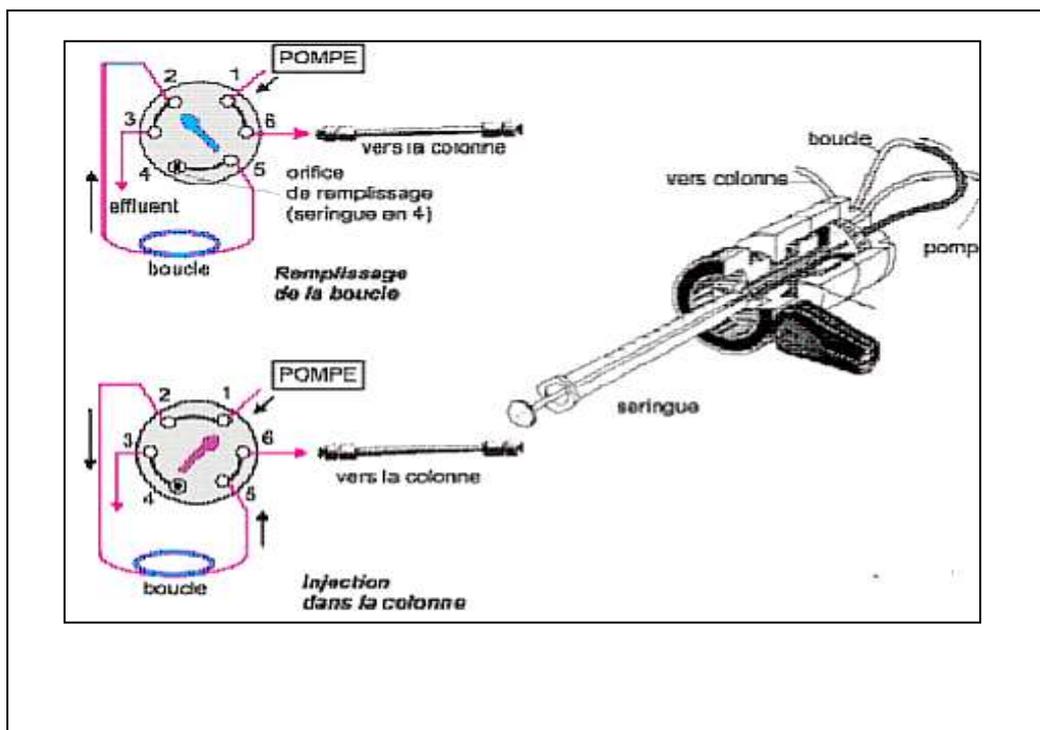


Figure 8: Injection avec une boucle : Remplissage de la boucle; et injection dans la colonne.

1.1.4.4. Colonne et phase stationnaire

La colonne se présente comme un tube, le plus souvent en acier inoxydable, dont la longueur et le diamètre intérieur présentent des différences selon les modèles. En HPLC, La plupart des colonnes ont une longueur de 10 à 30 cm et un diamètre intérieur de 4 à 10 mm, avec des tailles particulières de 5 à 10 μm . Ce type de colonne offre souvent de 40 000 à 60 000 plateaux théoriques. [84]

De nombreux types de phases stationnaires sont utilisés en HPLC, notamment : [76]

- De la silice, de l'alumine ou du graphite poreux, utilisé en chromatographie en polarité de phase normale, où la séparation repose sur une adsorption différentielle et/ou une distribution de masse ;
- Des résines ou polymères à groupement acides ou basiques utilisés en chromatographie à échange d'ions, où la séparation repose sur la compétition entre les ions à séparer et ceux de la phase mobile ;
- De la silice ou des polymères poreux utilisés en chromatographie d'exclusion où la séparation repose sur les différences de volumes entre molécules, ce qui correspond à une exclusion stérique ;
- Divers supports chimiquement modifiés préparés à partir de polymères de silice utilisés en HPLC en polarité de phase inversée, où la séparation repose

principalement sur le partage des molécules entre la phase mobile et la phase stationnaire : [76]

- Des phases stationnaires chimiquement modifiées spéciales, tels que des dérivés de la cellulose ou de l'amylose, des protéines ou des peptides, des cyclo dextrines..., pour la séparation des énantiomères (chromatographie chirale) [76]

1.1.4.5. Détecteurs

Il existe actuellement plusieurs détecteurs, et qui sont classés selon :

- mise en évidence d'une propriété du soluté directement ou après réaction pré ou post-colonne avec un composé révélateur (spectrophotomètre UV/visible, fluorimètres),
- mise en évidence d'une modification de l'éluant (conductimètre, réfractomètre)

Les détecteurs spectrométriques dans UV/visible sont les plus utilisés en HPLC car ils sont peu sensibles aux fluctuations de débit et de température et un grand nombre de solvants ont une bonne transparence dans l'UV. [31]

1.1.4.5.1. Détecteur par spectroscopie UV-Visible

Il mesure l'absorbance absolue d'un solvant + soluté ou la différence d'absorbance entre le solvant et le solvant + soluté (en présence d'une cellule de référence) à longueur d'ondes fixe (détection monochromatique) ou à longueur d'ondes variable entre 190 et 800 nm ou à longueurs d'ondes multiples comme les réseaux de diodes (détection polychromatique).

L'inconvénient principal est que pour pouvoir être détectée la substance doit posséder des groupements chromophores (doubles liaisons par exemple). [90]

1.1.4.6. Intégrateur- enregistreur [90]

Il s'agit en fait d'un petit ordinateur qui récupère toutes les données issues des détecteurs, trace les chromatogrammes et intègre la surface des pics. Il imprime un rapport d'analyse donnant les temps de rétentions et les surfaces de chaque pic.

On peut le programmer pour qu'il fasse seul les divers calculs conduisant aux concentrations à partir de chromatogrammes étalon et des chromatogrammes des mélanges analysés [90]

1.1.4.7. Chromatogramme

Le résultat observable d'une analyse HPLC se présente sous la forme d'un chromatogramme, il se présente comme une séquence de pics gaussiens au-dessus d'une ligne de base.

Sur le chromatogramme, chaque pic correspond à un produit détecté. Un pic idéal a une forme de Gaussien. Le chromatogramme fournit une information qualitative : le temps de rétention (ce temps est identique pour un produit dans des conditions identiques) et une information quantitative : la surface et la hauteur des pics qui sont proportionnelles à la quantité de produit [43]

La chromatographie liquide de partage (HPLC) et la chromatographie liquide d'exclusion stérique (SE-HPLC) sont deux techniques analytiques utilisées afin d'analyser le produit fini à étudier.

1.2. Chromatographie HPLC de partage [52][69]

La séparation dépend des différences de solubilité des solutés dans la phase mobile et des différentes interactions des solutés avec la phase stationnaire. L'affinité de chaque constituant pour la phase stationnaire dépend de sa solubilité dans cette phase et de sa polarité. C'est la technique de chromatographie liquide la plus utilisée, elle fonctionne donc par partage de solutés entre deux phases non miscibles.

Ce mécanisme est surtout utile pour la séparation de molécules très polaires de masses molaires inférieures à 3000g/mol.

Il existe deux types de chromatographie de partage selon la polarité des phases stationnaires et mobile.

1.2.1. Chromatographie de partage sur phase normale (NPLC)

La phase normale est constituée du gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant de faible polarité [69]. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête. [19][21]

L'inconvénient d'une telle phase, est la détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations [21].

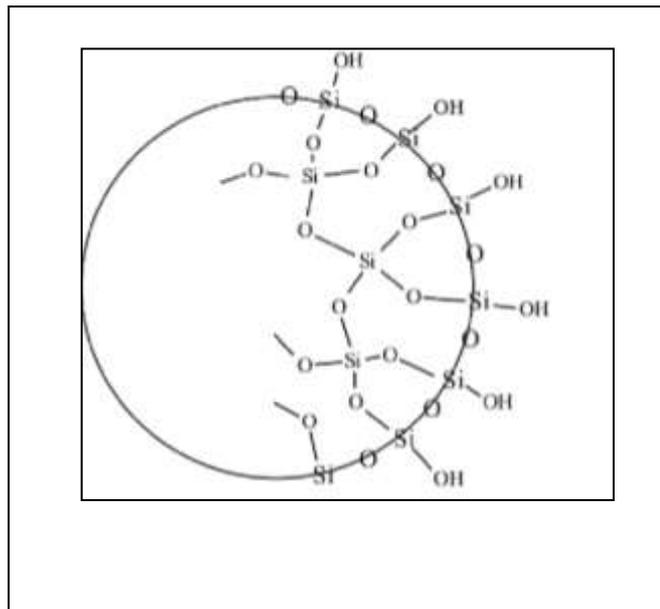


Figure 9 : Structure d'une particule de gel de silice

1.2.2. Chromatographie de partage sur phase inverse (RPLC)

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée majoritairement par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18) [18]. Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (tel que Acétonitrile (ACN), Méthanol, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. [2][21][69]

Le tableau n°4 ci-dessous présente quelques exemples de la composition des phases mobiles et stationnaires dans la chromatographie de partage en phase inverse et en phase normale :

Tableau 4 : Composition des phases mobiles et stationnaires dans la chromatographie de partage en phase inverse et en phase normale.

| Phases | Phase inversée | Phase normale |
|---------------------------|--|--|
| Phase stationnaire | Non polaire : -Silice greffée par une chaîne alkyle ou phényle | Polaire : -C ₃ H ₆ N(CH ₃) ₂ -C ₃ H ₆ NH ₃ - Diol |
| Phase mobile | Polaire : -Eau -Méthanol -Acétonitrile -Tétrahydrofurane | Non polaire : - n-hexane -Chloroforme -Ether |

1.2.3. Chromatographie d'exclusion stérique (SE-HPLC)

Ce type de chromatographie est utilisé pour la séparation des macromolécules telles que les protéines.

1.2.3.1.Principe

Les particules de la phase stationnaire présentent des pores de différentes tailles où pourront se loger les molécules de l'échantillon. Il n'y a pas d'interactions entre la phase stationnaire et les composés à éluer.

Les molécules sont plus ou moins retenues suivant leur taille et leur possibilité de pénétrer dans les pores de la résine. [65]

Les molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières. Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car induites dans le gel, leur migration est freinée [78]. Les solutés sont donc élués dans l'ordre des masses molaires décroissantes.

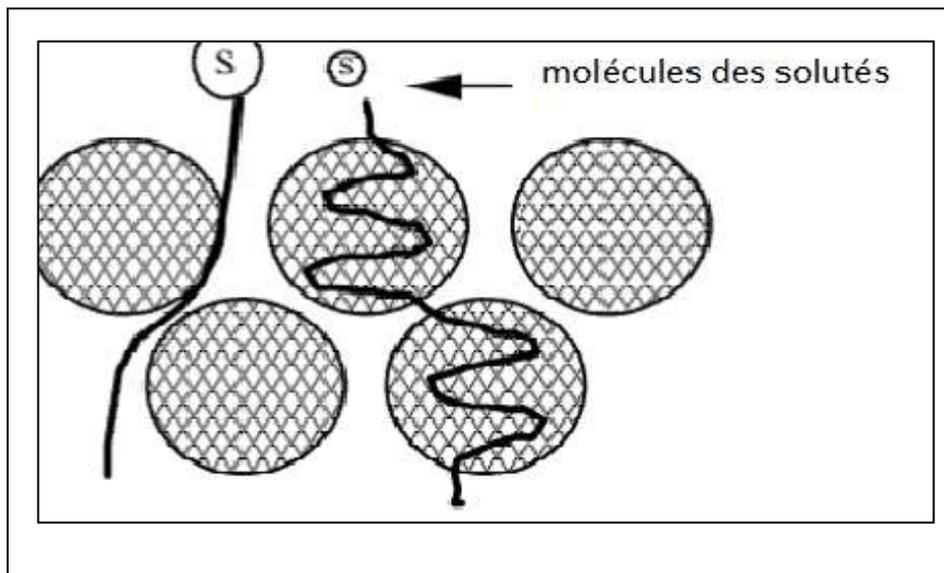


Figure 10: Schéma descriptif du mécanisme de la chromatographie d'exclusion stérique

1.2.3.2.Types de SE-HPLC

- Chromatographie de filtration sur gel : phase mobile aqueuse et phase stationnaire hydrophile (gels mous).
- Chromatographie de perméation sur gel : phase mobile organique et phase stationnaire hydrophobe (gel semi-rigide).

1.2.3.3.Les supports de la phase stationnaire

La colonne chromatographique doit être choisie en fonction de la taille des pores et des molécules à analyser.

Différents types de gel existent actuellement. On distingue les gels mous, semi-rigides et rigides. Seul ce dernier peut être utilisé avec des vitesses de phase mobile élevées.[33]

Gels mous

Ce sont des polymères à faible taux de pontage pour lesquels le gonflement est important. Il s'agit le plus souvent de dextrane rendu insoluble dans l'eau par réaction à l'épichlorhydrine. [33]

Gels semi-rigides

- Gels de polystyrène. Ce type de gel possède des propriétés remarquables et ne gonfle pratiquement pas. Il est utilisable en haute pression.
- Gel d'acétate de polyvinyle.
- Gels mixtes (dextrane-acrylamide) à taux de réticulation élevé. [33]

Gels rigides

Ils sont constitués par des silices poreuses ou des verres poreux. Les colonnes HPLC du type TSK correspondent à des phases stationnaires de ce type (poreuses, mais résistantes aux déformations mécaniques et donc utilisables sous des débits et pression élevés). [33]

1.2.3.4.Applications [33]

Ce type de chromatographie (associé ou non à des phénomènes d'échanges d'ions) est qualifié de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). Principales applications de ce type de chromatographie : [33]

- a) La séparation de groupes de molécules de masses molaires très différentes :
 - dessalage : les protéines et les polypeptides peuvent être dessalés ou séparés de substances de faibles masses molaires avant concentration.
 - extraction du phénol dans la préparation d'acides nucléiques.
 - interruption de réactions entre macromolécules et réactifs de faible masse molaire.
 - extraction de produits, cofacteurs ou inhibiteurs d'enzymes.
- b) Détermination de la masse molaire.
- c) Détermination des constantes d'équilibre pour le dessalage ou la séparation de protéines/petites molécules.

1.2.3.5.Appareillage

Le matériel SEC est identique à celui de l'HPLC classique. Les détecteurs les plus appropriés sont ceux à barrette de diode et ceux à réfractomètre. Les détecteurs UV peuvent également être employés avec le risque que certaines molécules ne soient pas détectées en raison de leur absence de chromophore. La colonne doit être choisie en fonction de la taille des pores et des molécules à analyser. Pour les protéines, on choisit généralement des pores de 300 Armstrong. [95]

2. Grandeurs utilisées en chromatographie

2.1. Grandeurs de rétention

2.1.1. Temps de rétention T_r

C'est le temps d'élution au maximum du pic mesuré à partir de l'injection. C'est la principale grandeur de rétention [70][76]. Il varie en fonction du débit, de la température d'élution, de la composition de la phase mobile et du vieillissement de la colonne [70].

Un chromatogramme type est schématisé, avec les paramètres principaux d'évaluation, sur la figure n° 11 suivante :

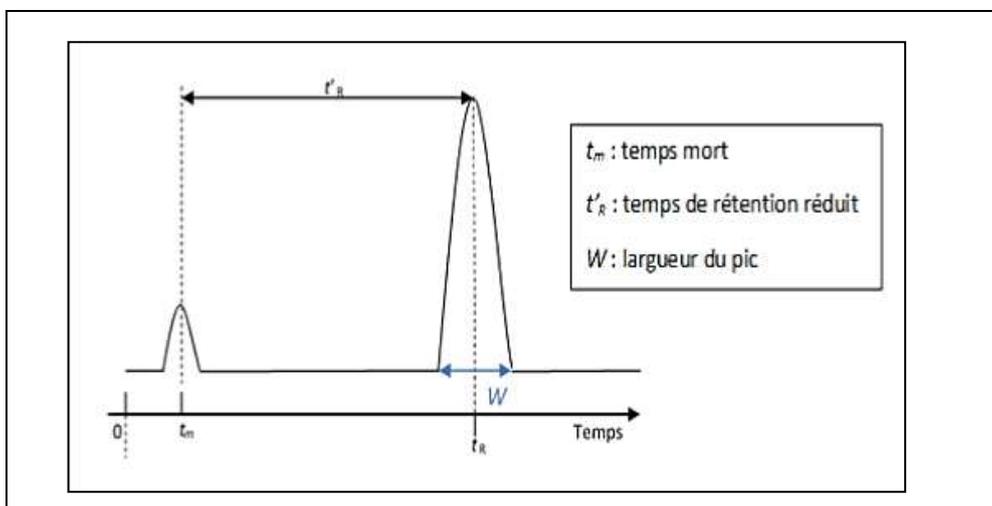


Figure 11 : Chromatogramme illustrant le T_r , T_m , T_r'

2.1.2. Le facteur de capacité k' (ou facteur de rétention)

K' est le paramètre le plus important en chromatographie liquide. Il traduit l'affinité d'un composé pour la phase stationnaire. Il rend compte de la faculté plus ou moins grande de la colonne à retenir un composé. Ce paramètre ne dépend pas du débit de la phase mobile, ni des dimensions de la colonne mais il est affecté par toutes les autres conditions chromatographiques. . [18][41]

Le facteur de capacité k' ou facteur de rétention k est défini comme suit :

$$k' = \frac{(C_s \cdot V_s)}{(C_m \cdot V_m)} = k \cdot \frac{V_s}{V_m}$$

- C_s et C_m sont les concentrations du soluté dans phase stationnaire et mobile.

- V_s et V_m sont les volumes de des phases stationnaire et mobile.

2.2. Grandeurs chromatographiques

2.2.1. Largeur d'un pic chromatographique

Les pics chromatographiques ont une allure gaussienne. Un pic peut être défini par sa surface A (calculée en assimilant le pic à un triangle), par sa hauteur h ainsi que sa largeur. [74][76].

La largeur d'une courbe de Gauss (figure n°12) est définie par :

- $W = \omega =$ largeur à la base du pic
- $Wh = \delta =$ largeur à mi-hauteur

$\sigma =$ écart type = $\frac{1}{2}$ largeur du pic à la hauteur des points d'inflexion, à 60,6% de la hauteur. [74]

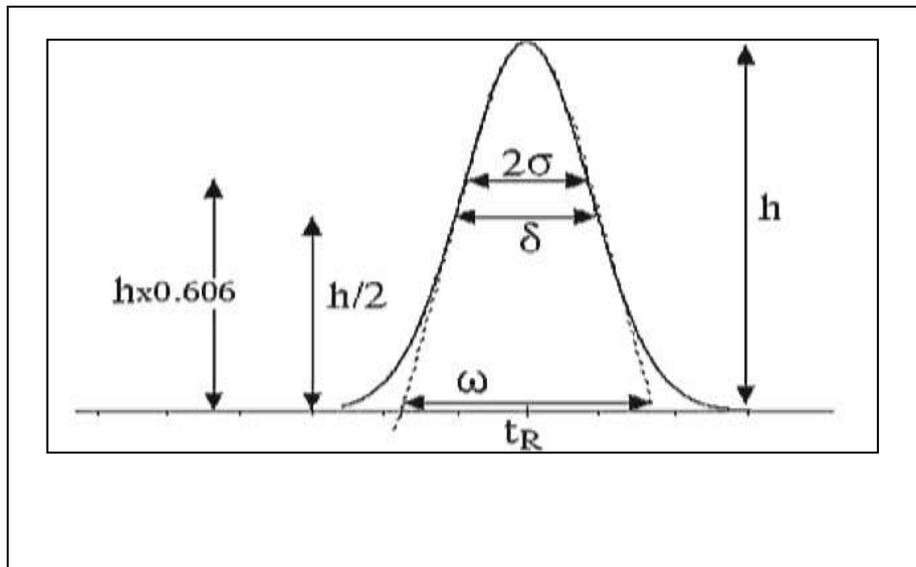


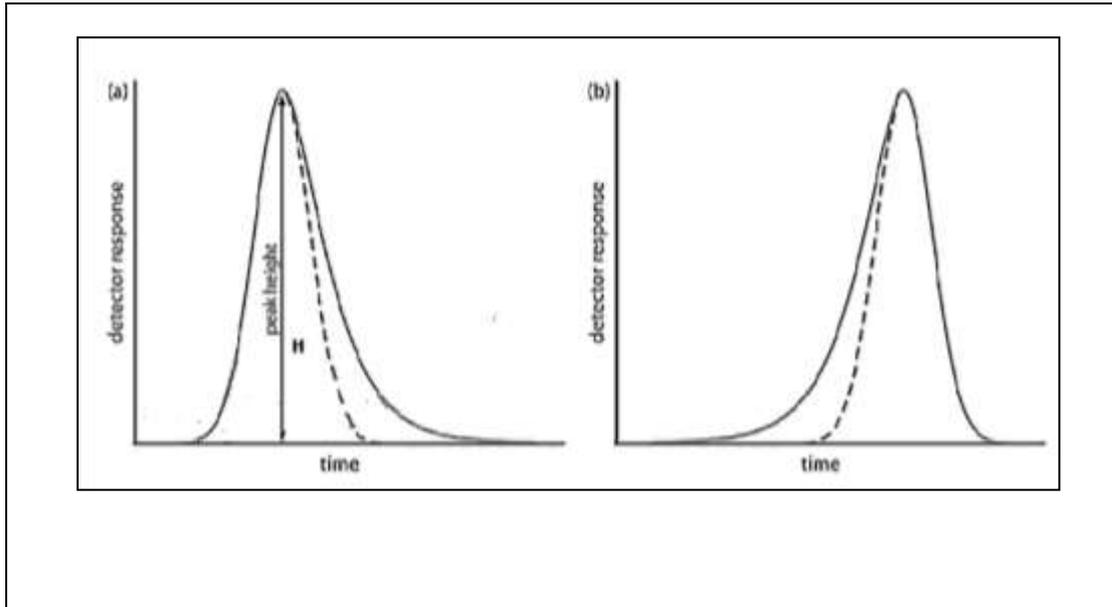
Figure 12 : Les largeurs d'une courbe de Gausse.

2.2.2. Le comportement d'un pic chromatographique

Dans les conditions idéales, un pic chromatographique doit avoir une forme gaussienne et présente une symétrie parfaite, mais en pratique plusieurs pics n'ont pas une meilleure symétrie, en plus un pic chromatographique peut présenter soit une trainée ou un fronting (figure n°13) : [19]

Figure 13 : Exemples d'asymétrie de pic chromatographique

2.2.3. Facteur d'asymétrie (facteur de trainée T_f ou Talling factor) [76]



Selon l'United States Pharmacopea (USP), le facteur de trainé est calculé à l'aide de l'équation suivante: [76]

$$Tf = \frac{W_{0.05}}{d}$$

- **W0.05** : Largeur du pic au vingtième de sa hauteur.

d: Distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum du pic et le bord d'entrée du pic au vingtième de sa hauteur.

2.3. Grandeurs de la colonne

2.3.1. Performance d'une colonne et nombre apparent de plateaux théoriques

La performance d'une colonne (efficacité apparente) peut être calculée, à partir de données obtenues dans des conditions isothermes, isocratiques ou isodenses, selon la technique utilisée, en termes de nombre apparent de plateaux théoriques N , à l'aide de l'expression suivante: [76]

$$N = 5,54 \left(\frac{Tr}{wh} \right)^2$$

N : nombre de plateaux théoriques ;

Tr : temps de rétention du pic correspondant au composant considéré ;

wh: largeur du pic à mi-hauteur ;

Tr et wh doivent être exprimés dans la même unité.

Le nombre apparent de plateaux théoriques dépend du composant considéré, ainsi que de la colonne et du temps de rétention. [44][76]

L'efficacité d'une colonne chromatographique est mesurée pour chaque composé, par le nombre apparent de plateaux théoriques N de la colonne. [45]

2.3.2. Hauteur Equivalente d'un Plateau Théorique (HEPT ou H)

Ce paramètre est calculé pour des composés de référence car il permet de comparer des colonnes de longueurs différentes, bien qu'il ne s'agisse en aucune façon d'une constante. Sa valeur dépend du composé choisi et des conditions de l'expérience.

$$HEPT = H = \left(\frac{L}{N} \right)$$

L : longueur de la colonne ;

N : nombre de plateau théorique.

2.3.3. Résolution R_s

La résolution correspond à une grandeur numérique caractérisant l'aptitude du système chromatographique (colonne, solutés, solvants) à séparer deux composés d'un mélange donnant des pics voisins. Ce paramètre nous renseigne sur la qualité de la séparation [11][69] La résolution R_s entre deux pics peut être calculée à l'aide de l'expression suivante:

$$R_s = 2 \left(\frac{Tr1 - Tr2}{wh1 + wh2} \right)$$

$Tr 2 > Tr 1$

$Tr 1, Tr 2$: temps de rétention des pics,

$wh1, wh 2$: largeur des pics à mi-hauteur.

Une résolution supérieure à 1,5 correspond à une séparation jusqu'à la ligne de base.

2.3.4. Sélectivité α

Le facteur de sélectivité α est défini par le rapport de coefficient de distribution de l'espèce la plus retenue, au coefficient de distribution de l'espèce la plus rapidement élué, il est calculé à partir de l'équation suivante: [18][69]

$$\alpha = \frac{Tr2 - T0}{Tr1 - T0} = \frac{K2}{K1}$$

La sélectivité α permet de préciser les positions relatives de deux pics adjacents 1 et 2 sur un chromatogramme.

3. Test de conformité de système

Le test de conformité du système constitue l'une des parties les plus importantes dans l'analyse chromatographique dont l'objet de ce test est de s'assurer de la performance du système utilisé pour l'analyse et de montrer que le système de mesure est satisfaisant au moment de l'analyse [76]

3.1. Définition

Conformément à l'USP, les tests de conformité du système (en anglais, System Suitability tests) font partie intégrante des méthodes chromatographiques gazeux et liquides. Ils visent à vérifier la performance du système chromatographique, par la vérification de quelques paramètres tels que la résolution et la reproductibilité de ce système. [2][19]

3.2. Période d'application du test

Le système doit satisfaire aux critères de conformité pendant toute la procédure chromatographique.

Selon les derniers directives de l'USP et l'ICH, le TCS doit être effectué avant et pendant tous les essais réglementés [19][76]

Cependant le plus souvent, le test de conformité du système (TCS) est fait au moment d'élancement de l'analyse.

3.3. Paramètres à vérifier pour l'évaluation d'un système chromatographique

Le test de conformité du système (TCS) est effectué en injectant cinq injections de la même vial du standard.

La répétabilité d'injection de la solution témoin est exprimée en pourcentage par l'écart type relatif Sr (RSD) estimé à partir de d'une série de 5 injections d'une solution témoin. (voir tableau n°5).

Le test de conformité du système permet d'évaluer la performance et de juger sur la capacité d'un système chromatographique à séparer les constituants d'un composé par l'utilisation des paramètres regroupés dans le tableau^{°6} ci-dessous, dont les normes soit fixées dans les référentiels tels que United States Pharmacopiea (USP) et la Pharmacopée européenne (Ph. Eur) [19][76]

Tableau 5 : Les paramètres du test de conformité.

| Paramètres | Description |
|--|--|
| Résolution Rs | Mesure du degré de séparation des pics au niveau du chromatogramme. |
| Répétabilité Sr (ou RSD) | Mesure de la reproductibilité du système durant l'analyse chromatographique. |
| Facteur de capacité K' | Mesure du degré de rétention de l'analyte. |
| Nombre de plateaux théoriques N | Mesure de l'efficacité de la séparation. |
| Facteur de Asymétrie As (ou TF) | Mesure de la symétrie d'un pic. |

Tableau 6 : Limites de paramètres du teste de conformité selon USP.

| Paramètres | Limites |
|---|------------------------|
| Résolution (Rs) | >2,0 |
| Répétabilité (Sr ou RSD%) | ≤1,0 pour 5 injections |
| Facteur de capacité | >2,0 |
| Nombre de plateaux théoriques | >2000 |
| Facteur de Asymétrie As (ou tailing factor Tf) | ≤2,0 |

Si au moins l'un des paramètres du système est non conforme à la norme fixée dans la procédure analytique, il convient de prendre les mesures suivantes: [19]

- Arrêter immédiatement de la séquence à réaliser.
- Procéder à un diagnostic convenable pour résoudre le problème.

- Faire les ajustements requis.

Réaliser un autre test de la conformité du système (TCS)

CHAPITRE V
PRESENTATION DU TERRAIN DE STAGE

Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques LNCPP



Figure 14 : Logo LNCPP

Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques est un établissement public à caractère administratif, doté de la personnalité morale et de l'autonomie financière, placé sous la tutelle du ministère chargé de la santé selon le décret exécutif n° 93-140 du 14 juin 1993 portant création, organisation et fonctionnement du Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques.

Il a pour mission principale le contrôle de la qualité et expertise des produits pharmaceutiques qui comprennent les médicaments, les réactifs biologiques, les formes galéniques, et tout autre produit nécessaire à la médecine humaine (article 169 de la loi N° 85°-05 du 16/02/1985).

Le laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques, étant un instrument d'expression de souveraineté nationale tenu dans le cadre de ses missions d'évaluer la qualité par les activités suivantes :

- L'étude des dossiers scientifiques et techniques des produits pharmaceutiques soumis à l'enregistrement.
- L'élaboration des méthodes et des techniques de référence à l'échelle nationale.
- La tenue des substances étalons et produits de référence à l'échelle nationale.
- La tenue et la mise à jour d'une banque de données techniques relative aux normes et aux méthodes de prélèvement, d'échantillonnage et de contrôle de la qualité des produits pharmaceutiques.
- La recherche technique et scientifique liée à son objet.
- La réalisation de toute étude en rapport avec sa mission.

- Le laboratoire est habilité à assurer des prestations d'expertise et à passer à cette fin des contrats et des conventions avec toute entreprise, administration ou autre organisme le sollicitant.
- Il est également habilité à assurer les prestations en matière de formation, notamment par l'organisation de stages appliquées concernant des méthodes ou à des techniques de contrôle de produits pharmaceutiques.
- Dans le cadre des procédures établies et conformément à la législation et à la réglementation en vigueur le laboratoire est habilité, dans la limite de ses missions, à établir les conventions de coopération avec les organismes étrangers similaires et avec les organisations internationales. **[100]**

Dans le cadre des activités liées à son objet le Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques assure à son personnel plusieurs types de formation afin de mettre à jour leurs connaissances et de développer leurs compétences en les initiant aux technologies nouvelles;

Deux sortes de formations sont ainsi dispensées :

- 1- Formation scientifique et pharmaceutique.
- 2- Formation administrative

Le LNCPP assure aussi la formation de stagiaires externes (algériens et étrangers).

Les techniciens du LNCPP ont été formés dans plusieurs domaines de contrôle tels que le contrôle des vaccins, des médicaments et des dispositifs médicaux, dans de différents pays au sein des organisations internationales gouvernementales et non gouvernementales.

Ces formations ont porté sur plusieurs axes :

- L'assurance qualité.
- Les affaires réglementaires (dans les domaines du médicament, des dispositifs médicaux et des réactifs).
- La documentation pharmaceutique (l'archivage des dossiers techniques et scientifiques des produits pharmaceutiques et la documentation scientifique).

Parmi les départements que comprend le LNCPP, on trouve : le département technico-réglementaire et le département des laboratoires spécialisés.

Le département technico- réglementaire est chargé du contrôle technico- réglementaire des médicaments soumis à l'enregistrement. Il comprend : un service enregistrement, un service évaluation de la qualité (pour les produits déjà enregistrés) et un service de documentation et d'archivage.

➤ **Département des laboratoires spécialisés**

Ces laboratoires sont complémentaires au contrôle technico-réglementaire et ils sont chargés de:

- Harmoniser les techniques d'analyse.
- Résoudre les problèmes techniques en assurant une base de documentation technique et scientifique à toutes les unités de contrôle.
- mettre en place des procédures et valider les laboratoires de contrôle qualité des unités de production des produits pharmaceutique par le biais du service Assurance qualité.

Les services de LNCPP sont :

1. **Le service physico – chimie** : Ce service concerne le contrôle de la matière première (caractères organoleptiques, granulométrie, identification et dosage, recherche et dosage des impuretés et substances apparentées) ainsi que celui du produit fini (caractères organoleptiques, identification et dosage, recherche et dosage des impuretés et substances apparentées et essais de pharmaco-technie).

C'est au niveau de ce service qu'on a fait notre stage pratique

2. **Le service de microbiologie – immunologie**: Le LNCPP évalue la qualité des produits pharmaceutiques sur le plan microbiologique (essai de stérilité et essai de propreté) ainsi que l'activité des antibiotiques et antiseptiques.

Le Laboratoire procède également au contrôle immuno-chimique : identification (Electrophorèse, Immunodiffusion) et dosage immunoenzymatique (Elisa).

3. Le service de pharmaco – toxicologie

3.1. Toxicité anormale

- Tolérance locale (oculaire, cutanée)
- Essais des pyrogènes (test au LAL)
- Titrages biologiques exemple : Héparine, FSH

4. Le service de l'assurance qualité: Ce service s'occupe de l'élaboration et la gestion des procédures, la diffusion et le retrait, l'identification et la présentation, le suivi des litiges ainsi que la validation des laboratoires de contrôle de qualité des unités de production.

5. Le service dispositifs médicaux : Ce service est chargé du contrôle du consommable médical à usage unique tel que : les seringues, les matières fibreuses (gaze, fil chirurgical, coton hydrophile...etc.) ainsi que les gants et les préservatifs.

Les missions de contrôle de qualité des produits pharmaceutiques qui incombent actuellement au LNCPP, sont transférées à l'Agence nationale des produits pharmaceutiques.

PARTIE 2

EXPERIMENTATION

PROBLEMATIQUE

Au niveau du laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutique LNCPP, il nous a été proposé de travailler sur un biosimilaire à base de LIRAGLUTIDE 6mg/mL « un stylo pré-rempli de solution injectable »

Afin d'obtenir un certificat de conformité (CC) qui est exigé pour la demande de sa décision d'enregistrement (DE) auprès des autorités sanitaires algériennes, cette forme pharmaceutique doit subir de différents essais physico-chimiques au niveau du service physicochimie du LNCPP

Au cours de ce travail, nous détaillerons l'ensemble de ces tests à effectuer pour statuer sur la qualité et la conformité de ce biosimilaire.

CHAPITRE I : CONTRÔLE QUALITE PHYSICO-CHIMIQUE DU LIRAGLUTIDE 6 mg/mL

1. Matériels

1.1. Verreries du laboratoire

- Fioles jaugées de classe A (200mL ; 500 mL ; 1000 mL;5000 mL).
- Éprouvettes graduées (1000 mL).
- Pipettes graduées de classe A (10 mL)
- Erlenmeyers.
- Bêchers
- Entonnoirs
- Flacons (500 mL ; 1000 mL)



Figure 15 : Verreries de laboratoires

1.2. Fournitures du laboratoire

- Vial d'injection de 02 mL (HPLC-Waters).
- Filtres nylon 0.45 μm .
- Verres de montre
- Spatules
- Seringues de 5 mL
- Gants à usage unique
- Pissettes à eau

| | | |
|---|---|---|
|  |  |  |
| (a) Vials d'injection de 0.2 mL | (b) Filtres nylon 0.45 µm. | (c) verres de montre |
|  |  |  |
| (d) Spatules | (e) Seringues | (f) Pissettes à eau |

Figure 16: fournitures du laboratoire utilisés dans le contrôle de liraglutide 6mg/ mL

1.3. Petits matériels

- Bain ultrason
- Filtre d'eau
- Agitateur magnétique
- pH- mètre (**HAVANA**) (précision relative = $\pm 0,005$)
- Balance analytique (**OHAUS**) (incertitude = $\pm 10^{-4}$ g)
- Etuve de laboratoire (Température maximale 70°C)
- Colonnes:
 - Luna® 50 C8 (2) \times 4,6 mm, 5µm ,100 A°
 - TSK gel® G 2000 SWXL 30 cm \times 7,7mm \times 5mm
 - Jupiter® 250 \times 4,6mm, 4µm, 90A°

| | | |
|---|--|---|
|  |  |  |
| Bain ultrason | Appareil de filtration d'eau | Agitateur magnétique |
|  |  |  |
| pH- mètre (HAVANA) | Balance analytique (OHAUS) | Etuve de laboratoire |

Figure 17 : Petits matériels du laboratoire utilisés dans le contrôle du liraglutide 6mg/mL

1.4. Equipements

- Chromatographe liquide haute performance couplé à un détecteur à barrette de diode (Alliance Waters e 2965- 2998PDA detector)



Figure 18 : Chaine HPLC couplée à un détecteur à barrette de diode (Alliance Waters e 2695-PDA detector)

1.5. Réactifs et standards

Les standards et réactifs utilisés dans ce travail sont mentionnés dans la liste suivante:

- Dihydrogénophosphate de sodium dihydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) SIGMA-ALDRICH® (Mr =119.997g/mol).
- Hydrogénophosphate de disodium dihydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) de EMSURE® (Mr =141.958g/mol).
- Phénol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) de Analar NORMAPUR® (pureté $\geq 99.5\%$).
- Acétonitrile (CH_3CN) (grade HPLC) (Mr =41.0519 g/mol).
- Standard Liraglutide (USP) 0.479 mg/mL
- Isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$) de HiPerSolvCHROMANORM® (Mr =60.095 g/mol).
- Hydroxyde de sodium NaOH (Mr =39.997 g/mol).
- Acide acétique (CH_3COOH) BIOCHEM CHEMOPHARMA® (Mr =97.995 g/mol).
- Acide orthophosphorique 85% de VWR CHEMICALS®
- Eau purifiée.

2. METHODES

Les différents essais réalisés pour contrôler la qualité physico-chimique de la solution injectable, suivent pratiquement les indications de la pharmacopée européenne 10^e édition et américaine (USP42-NF37) ainsi les méthodes internes inscrites dans le dossier technique du producteur de cette forme et les utilisent également comme référentiels principaux pour évaluer les résultats de ces essais.

Les différents référentiels des méthodes et critères d'acceptation pour chaque essai sont détaillés dans le tableau n°7 suivant :

Tableau 7 : Les références des méthodes et des critères d'acceptation des tests à réaliser.

| Test | Référence de la méthode | Référence des critères d'acceptation |
|--|--|--------------------------------------|
| Caractères organoleptiques | Méthode Interne | Spécification Interne |
| Ph | Pharmacopée européenne 10 ^e édition | Spécification Interne |
| Identification et dosage du Liraglutide | Méthode interne | Spécification Interne |
| Identification et dosage des substances apparentées | Méthode interne | Spécification Interne |
| Identification et dosage du HMWP | Méthode interne | Spécification Interne |
| Identification et dosage du Phénol | Méthode interne | Spécification Interne |

2.1. Essai de contrôle qualité physico-chimique du Liraglutide 6mg/mL

2.1.1. Caractères organoleptiques

La solution doit être claire, incolore ou presque incolore et limpide. Avec absence de particules étrangères

2.1.2. Potentiel hydrogène pH

Le pH de la solution injectable LIRAGLUTIDE doit être compris entre 8 et 8.4

2.1.3. Identification et dosage du Liraglutide et ses impuretés

Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques réalisées pour l'identification et dosage de Liraglutide et ses impuretés sont citées dans le tableau n°8 suivant

Tableau 8 : Les conditions chromatographiques d'identification, dosage de Liraglutide et ses impuretés

| Condition chromatographiques HPLC-Barrette diode | |
|--|--|
| Système | HPLC water e2695 |
| Détecteur | 2489 UV-VIS |
| Type de détection | Barrette de di-iode (PDA) |
| Colonne chromatographique | C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm × 4 μm) |
| Mode d'analyse | Gradient de concentration |
| Débit | 1 mL/min |
| Longueur d'onde | 215 nm |
| Température de colonne | 35°C |
| Température d'échantillon | 6°C |
| Volume d'injection | 10 μl |
| Temps d'analyse | 40 in |

Conformité de système

- Variation de temps de rétention : La différence maximale des temps de rétention des pics de Liraglutide dans les chromatogrammes obtenus avec les 6 injections de la solution standard doit être ≤ 1 min

- RSD% des 6 injections répétées du la solution standard de Liraglutide **ne doit pas dépasser 2%**.
- Résolution (Rs) entre les impuretés A et Liraglutide obtenu avec la solution de contrôle A **ne doit pas être inférieure à 2**
- Nombre de plateaux théoriques (N) du standard de Liraglutide **ne doit pas être inférieur à 2000**.
- Facteur d'asymétrie (Tailing Factor, T_f) du standard de Liraglutide obtenu avec la solution de standard **doit être inférieur à 2**.
- Sensibilité de détection (D) doit être **80 % ≤ D ≤ 120%** :
 - ✓ Sensibilité de détection (D) est calculée entre les aires des pics des impuretés A obtenues avec la solution de contrôle A et ceux obtenues avec la solution de contrôle B.

2.1.4. Identification et dosage de HMWP

Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques réalisées pour l'identification et dosage de protéine de poids moléculaire élevé (**HMWP**) sont citées dans le tableau n°9 suivant

Tableau 9 : Conditions Chromatographiques pour l'identification et le dosage de (**HMWP**)

| Conditions chromatographiques HPLC-Barrette diode | |
|--|--|
| Système | HPLC waters e2695 |
| Détecteur | 2489UV-VIS |
| Type de détecteur | Barrette de di-iodé (PDA) |
| Colonne chromatographique (SE-HPLC) | Tosoh tsk-gel G2000 SWXL 7.8mn id*30cm; 5µm. |
| Mode d'analyse | Isocratique |
| Débit | 0.5ml/min |
| Longueur d'onde | 276nm |
| Température de colonne | 30°C |
| Température de l'échantillon | 6°C |
| Volume d'injection | 50µL |
| Temps d'analyse | 30min |

Conformité de Système

- RSD% des 6 injections répétées du la solution contrôle A ne doit pas dépasser 2%.
- Résolution (Rs) entre HMWP et Liraglutide obtenu avec la solution de contrôle A ne doit pas être inférieure à 2
- Facteur d'asymétrie (Tailing Factor, Tf) de HMWP obtenu avec la solution de contrôle A doit être comprise entre 0.8 Et 2.0
- Sensibilité de détection (D) doit être **80 % ≤ D ≤ 120%** :

- ✓ Sensibilité de détection (D) est calculée entre les aires des pics de HMWP obtenus avec la solution de contrôle A ($A_{\text{HMWP, control A}}$) et la solution de contrôle B ($A_{\text{HMWP, control B}}$)

2.1.5. Identification et dosage du Phénol

Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques réalisées pour l'identification et dosage de phénol sont citées dans le tableau n°10 suivant :

Tableau 10 : conditions chromatographiques pour l'identification et dosage de phénol

| Conditions chromatographiques HPLC-Barrette diode | |
|---|---|
| Système | HPLC waters e2695 |
| Détecteur | 2489UV-VIS |
| Type de détecteur | Barrette de di-iode (PDA) |
| Colonne chromatographique | C8(2)× 4,6 mm , 5µm ,100 A° |
| Mode d'analyse | gradient entre phase mobile R et phase mobile B |
| Débit | 1 mL/min |
| Longueur d'onde | 240 nm |
| Température de colonne | 45°C |
| Température de l'échantillon | 2-10°C |
| Volume d'injection | 10µl |
| Temps d'analyse | 10,8 min |

Conformité de système

- RSD% des 5 injections répétées de la solution standard phénol **ne doit pas dépasser 2%**.
- Taux de recouvrement entre les deux solutions standards phénol **doit être compris entre 98 et 102%** :

✓ Le taux de recouvrement est calculé par la relation suivante :

Avec:

Aire 1: la
aires des

$$\text{taux de recouvrement} = \frac{\text{Aire}_1}{\text{Masse}_1} \times \frac{\text{Masse}_2}{\text{Aire}_2} \times 100\%$$

moyenne des
pics

chromatographiques du standard 1

Masse 1: prise d'essai de standard 1

Aire 2 : la moyenne des aires des pics chromatographiques du standard 2

Masse 2: prise d'essai de standard 2

- Résolution (Rs) entre les impuretés A et Liraglutide obtenu avec la solution de contrôle A **ne doit pas être inférieure à 2**
- Nombre de plateaux théoriques (N) du standard de phénol **ne doit pas être inférieur à 1000.**
- Facteur d'asymétrie (Tailing Factor, T_f) du standard phénol obtenu avec la solution de standard doit être inférieur à 2.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Caractères organoleptiques

Le contrôle visuel de la solution à base de LIRAGLUTIDE 6mg/mL (voir figure n°21) montre que le stylo contient 3mL d'une solution claire, limpide incolore. Exempte de particules étrangères.



Figure 19 : Aspect de la solution injectable à base de LIRAGLUTIDE 6mg/mL

De ce fait, le caractère organoleptique est conforme

2. Potentiel hydrogène pH

Le pH obtenu de la solution injectable à LIRAGLUTIDE 6mg/mL est 8.11 .Cette valeur est comprise dans l'intervalle $8 \leq \text{pH} \leq 8.4$.

Ce qui rend le pH de la solution est conforme

3. Identification et dosage du Liraglutide et ses impuretés

3.1. Identification et dosage de Liraglutide

3.1.1. Identification du liraglutide

Les temps de rétention de la substance active, de référence et de l'échantillon analysé sont comparables.

Liraglutide est présent dans l'échantillon analysé.

3.1.2. Teneur du liraglutide

La teneur en Liraglutide est de 6.00 mg/mL. Cette valeur est dans l'intervalle entre 5.66 et 6.30 mg/mL

Ce qui fait que le dosage est conforme.

3.2. Identification et dosage des substances apparentées

La teneur en Impuretés hydrophiliques est de **0,09** ; elle est inférieure à **3.2%**

La teneur en impureté A est de **1.0 %**, elle est inférieure à **2%**

La teneur en Impuretés B est de **0,6 %**, elle est inférieure à **2.6%**

La teneur Impuretés C et de Impuretés hydrophobiques ne sont pas détectés (ND)

La teneur totale des impuretés est de **1.7**, elle est inférieure à **7.2%**

De ce fait toutes les valeurs obtenues des teneurs en % des impuretés sont conformes aux exigences données.

3.3. Conformité de système

Les résultats des six injections de la solution de la solution de standard, démontrant la répétabilité des résultats et la conformité de système

- La variation de temps de rétention est de 0.5 min. Cette valeur est inférieure à 1.0 min, alors elle est **conforme**
- L'écart type relatif ou RSD% de solution standard de liraglutide est de 0.1% cette valeur est < 2.0%. Donc il est **conforme**
- Facteur d'asymétrie (Tailing factor T) du standard de liraglutide est de 0.9871 cette valeur est comprise dans l'intervalle $0,5 \leq Tf \leq 1,2$. donc il est **conforme**
- Nombre de plateaux théoriques du standard de liraglutide est plus de **27000** ; cette valeur est > 2000, donc il est **conforme** à l'exigence donnée
- **La sensibilité de détection :**

| | |
|----------------------|--------------------------|
| D (%) | 119.39 |
| Spécification | $80\% \leq D \leq 120\%$ |

Cette valeur est comprise dans l'intervalle donnée d'où elle est **conforme**.

- **Résolution :**

| | |
|----------------------|----------------------------|
| Résolution | 2.2 |
| Spécification | ≥ 2 |

De ce fait, tous les tests de conformité de système pour l'identification et dosage de Liraglutide et ses impuretés sont conformes aux spécifications référentielles.

4. Identification et dosage de protéine de poids moléculaire élevé (HMWP)

4.1. Identification de protéine de poids moléculaire élevé HMWP

Les temps de rétention de LIRAGLUTIDE, de la solution de référence et de l'échantillon analysé sont **comparables**.

Les temps de rétention de la protéine de poids moléculaire élevé HMWP, de la solution de contrôle A et de l'échantillon analysé sont **comparables**.

La protéine HMWP est présente dans l'échantillon analysé.

4.2. Teneur en (HMWP)

La valeur obtenue de HMWP% dans l'échantillon est de 0.3% cette valeur est inférieure à 0.9%.

Ce qui fait que le dosage est conforme.

4.3. Conformité de système

Pour les six injections répétées du contrôle A, le RSD% est à 0,5, il ne dépasse pas 2%.

Ce qui rend ce paramètre conforme.

La **Résolution** des pics du contrôle A pour les six injections sont légèrement inférieur de la valeur demandée 2.0 .**Ce qui fait, que la résolution est acceptable.**

Le **Tailing facteur** pour HMWP dans le chromatogramme obtenu avec la solution de contrôle A dans toutes les six injections sont dans l'intervalle donné $0.8 \leq T \leq 2.0$. **Donc le Tailing Facteur (T_r) est conforme.**

Détection de sensibilité (D) :

D est égal à 85 %; le résultat n'est pas dans l'intervalle donné $80\% \leq D \leq 120\%$.

Alors ; la valeur obtenue est conforme à l'exigence donnée.

De ce fait, tous les tests de conformité de système pour l'identification et dosage de HMWP sont conformes aux spécifications référentielles.

5. Identification et dosage de phénol

5.1. Identification du phénol

Les temps de rétention de phénol, de la solution standard et de l'échantillon analysé sont **comparables**.

Le phénol est présent dans l'échantillon analysé.

5.2. Teneur en (mg/mL) de phénol

La concentration de phénol obtenu est de 5.4 mg/mL, elle est comprise entre 5,2 et 6 mg/mL

Ce qui fait que le dosage est conforme.

5.3. Conformité de système

- L'écart type relatif ou RSD% de solution standard de Phénol obtenu pour les 5 injections est de 0.3. Cette valeur est <1% donc **il est conforme aux exigences données**.
- Facteur d'asymétrie (T_f) du standard de phénol est **acceptable**
- Nombre de plateaux théoriques du standard pour les 5 injections de phénol obtenues sont plus de **27500** ; alors **il est conforme aux exigences données**.
- **Taux de recouvrement**
- Le taux de recouvrement est de 99.92% cette valeur est dans l'intervalle $98\% \leq F \leq 102\%$.

Le résultat obtenu est conforme à l'exigence donnée.

De ce fait, tous les tests de conformité de système pour l'identification et dosage de phénol sont conformes aux spécifications référentielles.

Tableau 11 : Résumé des résultats de contrôle qualité physico-chimique de LIRAGLUTIDE 6mg/mL

| | Liraglutide 6mg/mL | Conclusion |
|---|--|-----------------|
| Caractères organoleptiques | Le contrôle visuel de la solution montre que le stylo contient 3mL d'une solution claire, limpide incolore. Exempte de particules étrangères. | Conforme |
| pH | 8.11 | Conforme |
| Identification de PA | Liraglutide est présente dans l'échantillon analysé. | Conforme |
| Dosage de PA | 6.00 mg/mL | Conforme |
| Identification et dosage des impuretés | <ul style="list-style-type: none"> - Impuretés hydrophiliques : 0.09% - Impureté A : 1.00% - Impureté B : 0.06% - Impureté C : ND - Impuretés hydrophobiques ND - Impuretés totales= 1.73% | Conforme |
| Identification de HMWP | La protéine HMWP est présente dans l'échantillon analysé | Conforme |
| Dosage de HMWP | 0.3% | Conforme |
| Identification de phénol | Le phénol est présent dans l'échantillon analysé. | Conforme |
| Dosage de phénol | 5.4 mg/mL | Conforme |

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'analyse du médicament se décompose en succession d'étapes qu'on doit parfaitement maîtriser pour assurer la qualité du résultat final.

Un médicament ne peut être commercialisé qu'avant sa qualité ne soit jugée conforme en répondant à des normes bien précises.

Dans cette étude ; un contrôle physico-chimique a été effectué au niveau de service physico-chimie de laboratoire de contrôle des produits pharmaceutiques LNCPP sur un médicament issu de la biotechnologie (**LIRAGLUTIDE 6mg/mL**) en vue d'obtenir leur certificat de conformité (**CC**).

Ce contrôle a été réalisé en se référant aux spécifications de la pharmacopée Européenne 10^e édition ; la pharmacopée américaine USP42-NF37 et des méthodes internes.

Durant ce stage, nous avons participé au contrôle physico-chimique du **Liraglutide 6mg/mL**, les résultats obtenus ont montré que sur le plan physico-chimique il est conforme aux normes fixés dans le dossier technique.

Ce travail nous a permis d'améliorer nos connaissances acquises tout au long de notre cursus.

En outre ; il nous a permis de maîtriser quelques techniques analytiques par les quelles passe un médicament au sein du **Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (LNCPP)** avant qu'il obtient une autorisation de mise sur le marché.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A

- [1] Académie national de pharmacie, Rapport, « Médicament générique », p 25, 2012
- [2] AHUJA Satinder, 1989. Selectivity and delectability Optimization in HPLC, by John Wiley
- [3] A.J. Scheen; Le glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1), Nouvelle cible dans le traitement du diabète de type 2 . Revu Med Liège 2007; 62 : 4 , Page 217-221
- [4] A.J. Scheen et, L.F. Van Gaa : Le médicament du mois Liraglutide : analogue du glucagon-likepeptide-1 humain en une injection par jour pour le traitement du diabète de type 2 .Revu Med Liège 2010; 65 : 7-8, Pages 464-470
- [5] ALe Hir, J.C.Chaumeil, D. Brossard Pharmacie galénique, bonne pratique de fabrication des médicaments, 9ème Edition, Masson
- [6] : Algerie 360° Algérie : Réglementation Pour Les Médicaments Bio-Similaires Avant Fin 2017
- [7] AMIP, le secteur pharmaceutique marocain : réalités sur le prix des médicaments intérêt du secteur, Maroc, 2010.Haut-commissariat au plan

B

- [8] BIBLIOGRAPHY \l 1036 Direction de l'Environnement. (1998). Les Principes de L'OCDE de Bonnes pratiques de laboratoire. Paris)
- [9] EL BOURAKADI Khadija, 2015-2016, Optimisation et validation d'une méthode de dosage simultané de paracétamol et la caféine dans différentes formes pharmaceutiques : Comprimé, Sachet, et Gélule. Thèse Master Sciences et Techniques : CMBA Chimie des Molécules Bio Actives
- [10] Bulletin officiel N°2007/1bis- fascicule spécial; Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Bonnes pratiques de fabrication, Edition 2007.)
- [11] BURGOT Gwenola, BURGOT Jean-Louis, 2006. Méthodes instrumentales d'analyse chimiques et applications, 2e édition Paris Lavoisier.

C

- [12] C. Fusi, "Les biosimilaires dans les moindres détails," *Le Moniteur des pharmacies*, n° 2974, Mars 2013
- [13] Chromatoguide Appendix F. 1, F.20
- [14] Code de la santé publique - Article L5111-1. Code de la santé publique France 2020
- [15] Committee for medicinal products for human use. Guideline on comparability of medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues

- [16] Committee for Medicinal Products for Human Use, Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as, European Medicines Agency, 2006
- [17] Committee for Medicinal Products for Human Use, Draft Guideline on Similar Biological Medicinal Products, European Medicines Agency, 2013

D

- [18] DE GRAVE Jean, BERTHOU François et PROST Michel avec la collaboration de ARPINO Patrick et PROMÉ Jean Claude, 1956. Méthodes Chromatographiques Couplées à la Spectrométrie de Masse (Technologie et application dans les domaines de l'environnement, la pharmacologie et à la biochimie), 1956
- [19] DONG W.MICHAEL, 2006. Modern HPLC for Practicing Scientists, New Jersey: John Wiley and sons
- [20] Drucker DJ .Therapeutic potential of dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. Expert Opinion on Investigational Drugs January 2003, Vol. 12, No.1, Pages 87-100
- [21] DUBEREUIL.P, Introduction à la chromatographie

F

- [22] Feinberg, M. (2012). Labo-Stat, Guide de validation des méthodes d'analyse. Paris: TEC et DOC

G

- [23] Gautier JF, Fetita S, Sobngwi E, et al. Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. Diabetes Metab 2005 ; 31 : 233-42
- [24] Goumi. A d. (18,19,20 février 2000). Le médicament générique, principaux enjeux . Alger: Groupe SAIDAL
- [25] Guide de bonnes pratiques en diabétologie à l'usage des Praticiens 2015 (MSPRH)

H

- [26] Pr Halimi Serge, Le diabète de type 2 corpus médical, faculté de médecine de Grenoble ; Avril 2003
- [27] H.SCHELLEKENS, Assessing the bioequivalence of biosimilars, the Retacrit® case, I
- [28] ICH, international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products Q6b, dated 10 march 1999.

[29] ICH, ICH Topic Q 5 E Comparability of Biotechnological/Biological Products, 2005]

[30] [ICH, Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals, 2011]

J

[31] JACOB 2010 (SAINT –BALDOPH) chiffre d'affaire résultats, bilans..

[32] J-E Allain, Leviers et innovations en achats hospitaliers, Hospira, 2012

[33] Professeur JEAN -LOUIS ; CUQ CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

[34] J-F Boe, A. Beck et Al, L'analyse des impuretés dans les substances actives d'origine biologique : le cas des anticorps monoclonaux, STP pharma pratiques, 2014

[35] J-L. Prugnaud, J-H. Trouvin, Les biosimilaires, Springer, 2011

[36] J-L.Prugnaud , Législation européenne sur les biosimilaires : les recommandations de l'EMEA concernant la qualité, Néphrologie & Thérapeutiques, 2009 ,vol.5,3-5.

[37] J. Marc-Aiacha, E. B. (5ème édition). Initiation à la connaissance du médicament. Paris: Masson

[38] Journal officiel de la République Algérienne ; l'article 210- Loi n°18-11 du 02 juillet 2018 relatif à la définition de la spécialité générique].

[39] Journal officiel de la République Algérienne 2018 N46- Art. 208.

[40] Journal officiel de la République Algérienne N° 46 29 juillet 2018.

K

[41] AKEVICH Yuri, ROSARIO Lobrutto, 2007. HPLC for Pharmaceuticals Scientists, New Jersey John and Sons

[42] KILADJIAN, 2011

[43] KOSTARNOI, et Al 2008

[44] KROMIDAZ Stavros, 2006. HPLC Made to Measure, A Practical Handbook for Optimization Wiley-VCH Verlag GmbH

[45] KROMIDAZ Stavros, 2016. The HPLC Expert Possibilities and Limits of Modern High Performance Liquid Chromatography, Wiley VCH

L

[46] LANET J. Système d'assurance de qualité dans l'industrie du médicament : contribution à leur conception, leur organisation, leur vérification : Thèse D : Pharm : 1985)

[47] Laurent Buisine. La qualité et son management en industrie pharmaceutique : s'imposer un cadre restrictif ou plutôt s'ouvrir à de nouveaux horizons ?. Sciences pharmaceutiques. 2016. hal-01731751

[48] loi 08-13 du 20 juillet 2008 modifiant et complétant la loi 85-05 relative du 16 février 1985

- [49] LOUGH J W, WAINER I.W, 1996. High Performance Liquid Chromatography Fundamental Principles and Practice, Chapman & Hall
- [50] L.ZUNIGA,B.CALVO, Regulatory aspects of biosimilars in Europe, 2009 Trends in Biotechnology, Vol.27, No.7,p385-387.- EMEA/CPMP/BWP/3207/00, 2003

M

- [51] M. A. Schenerman, B. R. Sunday, S. Kozlowski et al, "CMC Strategy Forum Report : Analysis and Structure Characterization of Monoclonal Antibodies," BioProcess Technical, 2004
- [52] MENDHAM et Al 2008, Analyse Chimique Quantitative de VOGEL, traduction et révision scientifique de la 6e édition anglaise par Jon Toulle et Moniaque Mottet.
- [53] Médicament biosimilaire - conseil scientifique de France Lymphome Espoir
- [54] Les médicaments biosimilaires dans l'UE Élaboré conjointement par l'Agence européenne du médicament et la Commission européenne
- [55] Medicine and Healthcare products Regulatory Agency, MHRA
- [56] Model certificate of analysis. In: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Thirty-sixth report. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 2002, annexe 10 (OMS, Série de Rapports techniques, N° 902
- [57] MONOGRAPHIE DE PRODUIT « liraglutide 6mg/mL »

O

- [58] OMS. Thème de santé : le diabète ; Aide- mémoire n° 312 ; Octobre 2013.

P

- [59] P. Bogaert, E. Lietzan, L. Sim et al, Biosimilar regulation: important considerations and global developments, Practical Law Company , 2011
- [60] Perspectives politiques de l'OMS sur les médicaments — Une réglementation pharmaceutique efficace : assurer l'innocuité, l'efficacité et la qualité des médicaments-Novembre 2003-Organisation mondiale de la Santé-Genève
- [61] Pharmacopée Européenne neuvième édition, Tome I, 2017
- [62] La pharmacopée Européenne 10ème édition - Prescriptions générales
- [63] P. Seymour, S. Dana Jones, H. L. Levine, "Technology Transfer of CMC Activities for MAb Manufacturing," BioProcess International, 2010

R

- [64] Rapport CNES : comité ad hoc sur les stratégies de sante publique et la sécurité sanitaire nationale, THEME N° 3 : politique pharmaceutique nationale, octobre 2010.
- [65] ROUESSAC et Al.2009

S

- [66] Scheen AJ. Etude ADOPT : quel antidiabétique oral initier chez le patient diabétique de type 2 ? Revu Med Liège 2007; 62 : 1 :48-52)
- [67] Schramm TK, Gislason GH, et coll ; Mortality and cardiovascular risk associated with different insulin secretagogues compared with metformin in type 2 diabetes, with or without a previous myocardial infarction: a nationwide study. Eur Heart J. 2011 Aug;32(15):1900-8
- [68] Série de Rapports techniques, N° 957, 2010- Annexe 1-Règles OMS de bonnes pratiques applicables par les laboratoires de contrôle qualité pharmaceutique Organisation mondiale de la Santé OMS,
- [69] SKOOG. WEST. HOLLER, Traduction et révision par BUESS-HERMAN Claude, DAUCHOT-WEYMERRS Josette et DUMONT Freddy, Chimie Analytique (SKOOG. WEST. HOLLER), 1997.]
- [70] SNYDER Liyod et al, 1997. Pratical HPLC Méthod développement, 2 ème édition USA: John Wiley and sons
- [71] Système Qualité Pharmaceutique (ICH Q10) ANSM - Mai 2013)
- [72] Système modèle d'assurance de la qualité pour agences - Annexe 3- d'approvisionnement WHO Technical Report Series No. 986, 2014

T

- [73] Theme memiore LA QUALITE ET SON MANAGEMENT EN INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE : S'IMPOSER UN CADRE RESTRICTIF OU PLUTÔT S'OUVRIR A DE NOUVEAUX HORIZONS ? UNIVERSITE DE LORRAINE 2016-FACULTE DE PHARMACIE
- [74] Théorie de la chromatographie, cour de chromatographie (Master 2 chimie), Orsay
- [75] Touraine, M. Ministère des affaires sociales, de la santé et des droits des femmes.2013. diponible sur « médicaments. Gouv.fr »
- [76] Tome IPharmacopée Européenne neuvième édition, , 2017

U

- [77] U.S. Food and Drug Administration.2011. Guidance for Industry, Process Validation: General Principles and Practices. Rockville: 201

V

- [78] Vanthuyne 2010, La chromatographie sur support chiraux, Montpellier

W

- [79] Wangani, l'étalonnage, outil d'amélioration des performances dans les organisations publiques, Paris, Juin 2010
- [80] World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Geneva: WHO; 1999

- [81] World Health Organization, Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology, 2013
- [82] World Health Organization, Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs), 2009.

Y

- [83] Dr Youssef KHAYATI- MÉDICAMENTS BIOSIMILAIRES AVENIR DU GÉNÉRIQUE-4^{ème} Journée Pharmaceutique de Mohammedia - Mohammedia – 25/04/2009
- [84] YURI.K et ROSARIO.L, 2007

Z

- [85] Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformine action. J Clin Invest 2001;108:1167-74

WEBOGRAPHIE

- [86] 123bio.net.
- [87] (<https://www.ansm.sante.fr/L-ANSM>) (consulté le 17/06/2020)
- [88] Bonnes pratiques de laboratoire sur le site de l'ANSM 2017 www.ansm.sante.fr. Consulté le 13/06/2020 [En ligne
- [89] bulletin officiel n°2007/1bis agence française de sécurité sanitaire des produits de santé : Bonnes pratiques de fabrication dans. sur : www.ansm.sante.fr. Consulté 05/07/2020
- [90] <http://www.chimie-briere.com/>
- [91] <https://www.edqm.eu/fr/produits-biotherapeutiques> 07/07/2020
- [92] (<https://fr.wikipedia.org/wiki/Liraglutide>
- [93] Site web de Food and Drug Administration www.FDA.gov, consulté le 12/06/2020. [En ligne]
- [94] Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues: <<http://www.emea.europa.eu/>>.
- [95] <https://www.lachimie.fr/analytique/chromatographie/HPLC/chromatographie-exclusion.php>
- [96] <https://www.eupati.eu/fr/types-de-medicaments/medicaments-biologiques/>
- [97] Site web de l'Organisation internationale de normalisation <https://www.iso.org/fr/about-us.html>, consulté le 26/02/2020
- [98] <https://pharmaspecific.com/international-conference-of-harmonisation-ich> consulté le 18/02/2020
- [99] <https://www.pharmacopoeia.com/>. Mis à jour le : 01/01/2019.Consulté le 04/03/202

- [100] <http://www.sante.dz/lncpp/presentation.htm> consulte le 29/02/2020
- [101] <http://www.sante.dz/Dossiers/direction-pharmacie/PHARM.HTM#114>
14/06/2020
- [102] <https://www.vidal.fr/Medicament/victoza-94254-pharmacodynamie.htm>
- [103] Site web de l'Organisation mondiale de la santé <https://www.who.int/fr/>,
consulté le 25/02/2020
- [104] <http://www.usp.org> U.S.Pharmacopeia Mis à jour le : 01/01/2019 Consulté le
04/03/2020

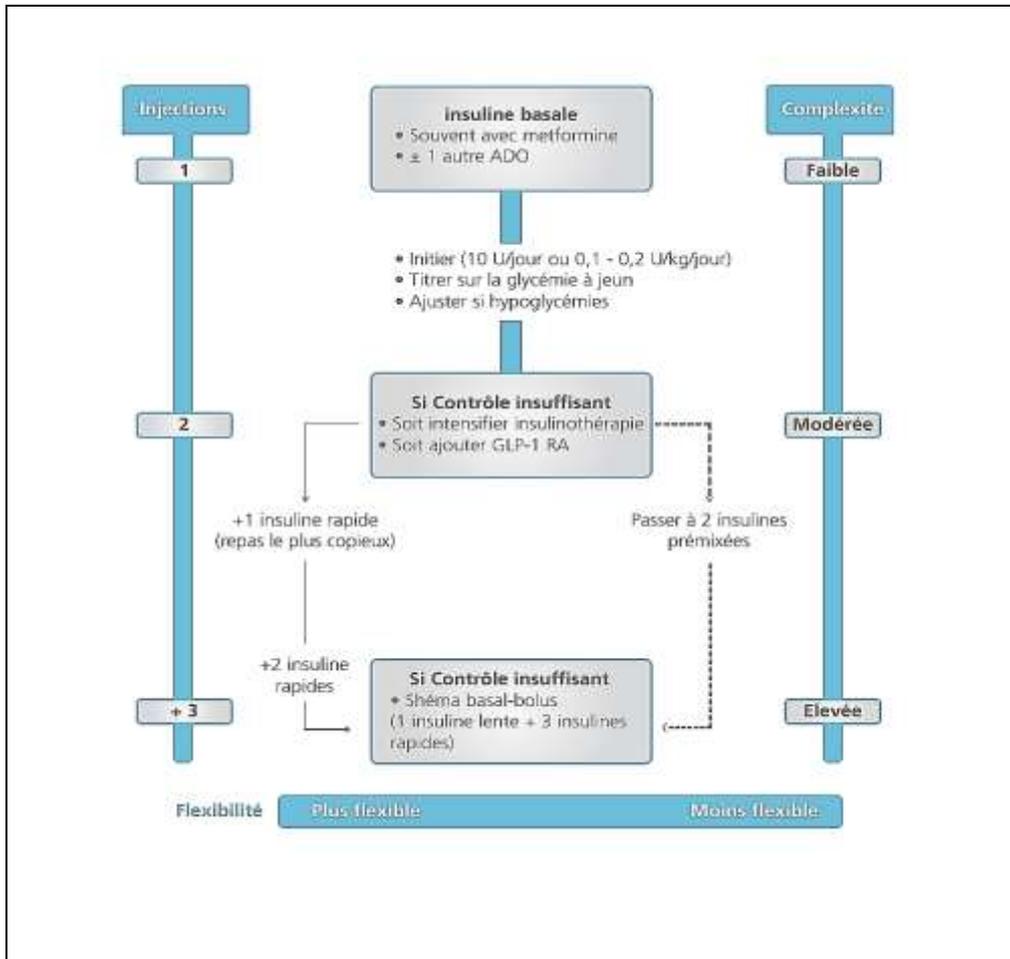
ANNEXES

Annexe 1 : Type d'insulines disponibles en Algérie (Guide de diabétologie 2015 MSPRH).

| Type d'insuline | Début d'action | Maximum d'action | Fin d'action | Présentation |
|---|----------------|-------------------|--------------|--|
| Insulines humaines rapide (Délai entre l'injection et repas 30 min) | | | | |
| Umuline | 20 min | 2 h | 6 - 8 h | Cartouche penfill 3cc |
| Actrapid | 20 min | 2 h | 6 - 8 h | Cartouche penfill 3cc Flacon 5 et 10cc |
| Insudal rapid | 20 min | 2 h | 6 - 8 h | Flacon 5 et 10cc |
| Insulines humaines intermédiaires | | | | |
| Insulatard | 1h 30 | 4 à 6 h | 12 à 16 h | Cartouche penfill 3cc Flacon 5 et 10cc |
| Insudal basal | 1 h 30 | 4 à 6 h | 12 à 16 h | Flacon 5 et 10cc |
| Insulines humaines mixtes | | | | |
| Mixtard 30/70 | 30 min | 1 à 3 h | 12 h | Cartouche penfill 3cc Flacon 5 et 10cc |
| Insudal Comb 25 | 30 min | 1 à 3 h | 12 h | Flacon 5 et 10cc |
| Insulines analogues rapides (Injection juste avant les repas ou 15 mn après le début du repas) | | | | |
| Aspart (NovoRapid) | 5 à 10 min | 30 min | 3 à 5 h | Stylo jetable 3cc Stylo rechargeable 3cc |
| Glusine (Apidra) | 5 à 10 min | 30 min | 3 à 4 h | Stylo jetable 3cc |
| Lispro (Humalog) | 5 à 10 min | 30 min | 3 à 5 h | Stylo rechargeable 3cc |
| Insulines analogues mixtes | | | | |
| Biaspart 30 NovoMix 30 | 15 min | 1 à 4 h | 12 h | Stylo jetable 3 cc Stylo rechargeable 3cc |
| Humalog Mix 25 | 15 min | 1 à 4 h | 12 h | Stylos rechargeable 3cc |
| Humalog Mix 50 | 15 min | 1 à 4 h | 12 h | Stylo rechargeable 3cc |
| Insulines analogues basales (lentes) | | | | |
| Insuline glargine (Lantus) | 2 à 5 h | Profil en plateau | 24 h | Stylo jetable 3cc Flacon 5 et 10cc |

| | | | | |
|-----------------------------------|---------|-------------------|------|---|
| Insuline detemir (Levemir) | 2 à 5 h | Profil en plateau | 24 h | Stylo jetable 3cc Stylo rechargeable 3cc |
|-----------------------------------|---------|-------------------|------|---|

Annexe 2 : Stratégie de l'insulinothérapie dans le diabète de type 2.



RÉSUMÉ ET MOT CLÉS

Résumé

Afin d'obtenir la décision d'enregistrement (DE) et d'être commercialiser dans le marché algérien, un médicament biosimilaire, comme tout un nouveau médicament générique ; doit faire l'objet d'un contrôle qualité physicochimique.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la qualité physicochimique d'un médicament biosimilaire dont le principe actif est le LIRAGLUTIDE 6mg/mL, indiqué dans le traitement de diabète type II.

Dans ce but, des différentes analyses de contrôle physicochimique ont été réalisées au niveau de service de physicochimie de laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques (LNCP) , tel que les essais d'identification , dosage du Liraglutide et ses impuretés, ainsi de l'un des excipients utilisé « le phénol » .

Les résultats obtenus permettent de conclure que ce médicament biosimilaire est conforme, sur le plan physicochimique, aux normes fixées dans le dossier technique de producteur et exigées par la Pharmacopées Américaine USP42-NF37 et la Pharmacopée Européenne 10^{ème} édition.

Mots clés:

Contrôle, Qualité, Physico-chimique, médicament biosimilaire, essais, normes.

Abstract

In order to obtain the registration decision and be marketed in the Algerian market; a biosimilar drug; like a whole new generic drug; must to be subject to appropriate physicochemical quality control.

The objective of this study is to evaluate the physicochemical quality of a biosimilar drug, whose active ingredient is LIRAGLUTIDE 6mg/mL; indicated for the treatment of diabetes type II.

For this aim; various physicochemical control analyzes were carried out at the physiochemistry service of the national laboratory for control of pharmaceutical products, such us the assays of identification and dosage of liraglutide and its impurities, and of one of the excipients used with; the phenol.

The results obtained from these assays allowing to conclude that this biosimilar drug complies, from a physicochemical level, with the standards set in the manufacturer's technical file and required by the American Pharmacopoeia USP42-NF37 and the European Pharmacopoeia 10th edition.

Keywords:

Control, Quality, physicochemical control, biosimilar drug, tests, standards.

ملخص

من اجل الحصول على قرار التسجيل قبل طرحه في السوق، دواء حيوي بديل مثله مثل أي دواء جنيس جديد، يجب ان يخضع الى اختبارات مراقبة الجودة

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم الجودة الفيزيائية والكيميائية لدواء حيوي بديل مستعمل في علاج مرضى السكري من النوع الثاني ليراغليتيد 6 مع/مل

لهذا الغرض تم اجراء العديد من تحليلات مراقبة الجودة الفيزيائية الكيميائية للمادة الاولية والشوائب وبعض الصواغات "الفينول"، على مستوى وحدة التحاليل الفيزيوكيميائية التابعة للمختبر الوطني لمراقبة جودة المنتجات الصيدلانية.

النتائج التي تم الحصول عليها تسمح لنا باستنتاج أن هذا الدواء الحيوي يتوافق ، من وجهة نظر فيزيائية كيميائية ، مع المعايير المحددة في الملف الفني للشركة المصنعة والمطلوب من قبل دستور الأدوية الأوروبي الطبعة العاشرة والامريكي USP42-NF37

الكلمات المفتاحية

مراقبة، الجودة، المراقبة الفيزيوكيميائية ، منتج حيوي بديل، دواء ، اختبار، معايير

Nom et Prénom: GAMANE Zahia

Adresse mail : ahla28ahla@gmail.com

Nom et Prénom: IZEM WassilaFella

Adresse mail : wassilafelleizem@gmail.com

Nom et Prénom: SERSOUN Sarra

Adresse mail : serdounsarra@gmail.com