

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri
FACULTE DE MEDECINE
TIZI OUZOU

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة مولود معمري
كلية الطب
تيزي وزو

ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⵏ ⵉⵎⵎⴰⵔⵉⵜ ⵏ ⵉⵏⵙⴰⵎⵏ ⵏ ⵜⴰⵖⴻⵔⴰⵏⵜ ⵏ ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⵏ ⵜⴰⵖⴻⵔⴰⵏⵜ ⵏ ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ

Département de Pharmacie
N° D'ordre :

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

Présenté et soutenu publiquement

Le : 2 juillet 2018

En vue de l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Thème :

PRODUITS ISSUS DE LA BIOTECHNOLOGIE APPLICATION AUX INSULINES

Réalisé par :

M^r ABDENNOURI Abdel Hamid

M^r ASSEM Noureddine

Encadré par :

D^r MOUHOUB Latifa

Membres du jury :

D^r F. KESSAL

MAHU

Faculté de Médecine

UMMTO

Présidente

D^r A. MAKHLOUF

MAHU

LNCPP

ALGER

Examineur

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2017/2018

REMERCIEMENTS

Ce présent mémoire a été réalisé au Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (LNCPP).

Tout d'abord on tient à exprimé toute notre profonde gratitude et remerciements à Mr. CHADER Henni, Professeur en Pharmacologie et chef service de l'unité pharmaco-toxicologique du LNCPP ainsi que son équipe de travail pour leur accueil chaleureux et amical, ainsi que la mise à notre disposition de tous les moyens humains, matériels et animales constituant ainsi un milieu de travail adéquat pour la réalisation de ce mémoire.

On remercie notre promotrice Dr. MOUHOU B Latifa Maitre assistante en pharmacologie, pour nous avoir encadrés, aidés, orientés et conseillés ainsi que pour la correction continue de nos erreurs.

On remercie encore Dr. NAKHOUL Khaoula pour ses corrections et ses orientations.

Aux membres du jury

Messieurs, mesdames, les jurys, vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail, on vous adresse l'expression de notre ample reconnaissance.

Et enfin on tient à exprimer notre sincère reconnaissance et nos vifs remerciements à tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à l'élaboration de ce travail en l'occurrence nos parents et familles ainsi que nos amis qui n'ont jamais cessés de nous encourager.

Dédicaces

A cœur vaillant rien d'impossible

A conscience tranquille tout est accessible

Quand il y a la soif d'apprendre

Tout vient à point à qui sait attendre

Quand il y a le souci de réaliser un dessein

Tout devient facile pour arriver à nos fins

Malgré les obstacles qui s'opposent

En dépit des difficultés qui s'interposent

Les études sont avant tout

Notre unique et seul atout

Je dédie ce mémoire ...

A Ma très chère mère BOULHARZS Nacira

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

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.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A la mémoire de Mon Père Mohamed

Aujourd'hui je suis là en réalisant ton rêve, la pharmacie était ton choix dès le début, Aucun mot ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Aujourd'hui vous n'êtes pas là devant moi en regardant mon succès qui est le vôtre, mais vous êtes toujours donc mon cœur, repose en paix papa.

A mes frères et sœurs, ma famille paternel et maternelle

Vous avez toujours été présents pour les bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie professionnelle et personnelle. Veuillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts.

A mes chers Collègues

**BENAMIROUCHE Adessamie, DAHOUS Walid, ALLOUACHE Said, CHALABI Zakaria,
BOUDJELLOULI Abderazak, CHABLA YOUNES, GACEM Foudhil, MEZANI Azzedine...**

AKKACHA Dyhia, CHERIFI salsabila, BATATACHE Sonia...

Un remerciement particulier et sincère pour tous vos efforts fournis.

En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

A mes amis spéciaux

***Smail et Fethi BELKADI, BELGACEM Abdelhassib, Djebri walid, MAHAS Mohamed,
Mahdi Ahmed, CHAOUCHE Nacer, HADDACHE Sifeddine.***

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, et des amis sur qui je peux compter.

En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Liste des abréviations

AA : Acide Aminé

ADN : Acide DesoxyriboNucleique

ADN-r: ADN recombinant

ADP: Adenosine Di Phosphate

AMM : Autorisation de Mise sur le Marche

ANOVA: Analys Of Variance

ARNm: Acide RiboNucleique messenger

ATP: Adenosine Tri Phosphate

ATPase: Adenosine Tri Phosphatase

CTD : Commun Technical Document- Dossier Technique Communi

DCI : Dénomination Commune Internationale

E. coli : *Escherichia coli*

ELISA: Linked Immuno Sorbent Assay

EMA : European Medicines Agency- Agence européenne des Médicaments

EU : Endotoxin Unit

FDA : Food and Drug Administration- agence americaine des medicaments et des produits alimentaires

GLP-1: Glucagon-like peptide-1

GLUT-1 : Glucose Transporter

HPLC : High Performance Liquid Chromatography-chromatographie liquide a haut performance.

ICH : International Conference on Harmonisation- conference internationale sur l'harmonisation.

IDE : Insulin Degrading Enzyme

IV : Intra Veineuse

LAL : Limulus Amoebocyte Lysat

LNCPP : Laboratoire de Contrôle des Produits Pharmaceutique

NPH = Protamine Neutre Hagedorn

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PC: Pharmaco Cinetique

PCR: Poly Chain Reaction

PD: Pharmaco Denamique

PDI: Protein Disulfide Isomerase

QOS: Quality overall summary

RIA: Radio Immunology Assay

SC : Sous Cutané

TA : Toxicité Anormale

UE: Union Europeen

UI : Unité Internationale

UV : Ultra Violet

Liste des figures

Figure1. Histoire de développement de la biotechnologie.....	3
Figure2. Représentation schématique d'une molécule de pro-insuline et sa conversion en Insuline.....	10
Figure 3. Schéma de la synthèse de l'insuline.....	11
Figure 4. Représentation schématique des mécanismes de stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose.....	12
Figure 5. Schéma du récepteur de l'insuline.....	14
Figure 6. Début et durée d'action de l'insuline humaine et de ces analogues.....	17
Figure 7. Schémas récapitulatif des différentes étapes de la production de l'insuline par génie-génétique.....	24
Figure 8. Organisation du format CTD.....	40
Figure 9. Schéma représentatif des principales différences entre un produit biosimilaire et un produit chimique.....	45
Figure 10. Profil d'activité de NovoMix 30 (___) et de l'insuline humaine biphasique 30 (---) chez des sujets sains.....	49
Figure 11. Profil cinétique du LEVEMIR.....	52
Figure 12. Souris mâle ou femelle pesant entre 17 et 22g.....	56
Figure 13. Souris utilisées pour le test de la toxicité anormale.....	56
Figure 14. Préparations des solutions à injecter.....	57
Figure 15. Injection sous cutanée des solutions préparées.....	57
Figure 16. Matériels utilisés dans l'essai de recherche.....	61
Figure 17. Lysat d'amœbocytes de limule et standard de référence d'endotoxines.....	61
Figure 18. Eau qualité LAL.....	62
Figure 19. Schéma récapitulatif de l'essai final.....	68
Figure 20. Incubation des tubes à 37°C pendant 1 h.....	68

Figure 21. Lots de souris utilisés.....	73
Figure 22. Solution fille 1 d'insuline aspartate/aspartate cristallisée.....	74
Figure 23. Solution fille 2 d'insuline aspartate/aspartate cristallisée.....	75
Figure 24. Solution fille 1 d'insuline détemir.....	76
Figure 25. Solution fille 2 d'insuline détemir.....	76
Figure 26. Glycémie à T0.....	76
Figure 27. Injection des préparations d'insuline.....	77
Figure 28. Mesure Des Taux De glycémie aux différents temps.....	77
Figure 29. Détermination Du pH de l'insuline détemir.....	82
Figure 30. Détermination du pH de l'insuline aspartate/aspartate cristallisée.	83
Figure 31. Représentation graphiques de l'évolution des taux de glycémie.....	84
Figure 32 : Variation Des taux de glycémie avec représentation des barres d'erreur.....	85

Tables des tableaux

Tableau 1. Produits biologiques commercialisés.....	5
Tableau 2. Stabilité/dégradation des produits biologique.....	9
Tableau 3. Récapitulatif des analogues de l'insuline.....	15
Tableau 4. Les Interactions médicamenteuses de l'insuline et les mesures à prendre.....	19
Tableau 5. Les Différentes modifications apportées aux analogues de l'insuline.....	25
Tableau 6. Tests de contrôle qualité dans la technologie ADN-r.....	27
Tableau 7. Séries des dilutions pour la validation initiale.	63
Tableau 8. Préparation des dilutions pour l'essai final du LAL test.....	69
Tableau 9. Evolution pondérale et observations après 24 h..	80
Tableau 10. Détermination des points finaux et les logarithmes des points finaux.....	81
Tableau 11. Résultats du LAL test de l'insuline détemir.....	82
Tableau 12. Résultats du LAL test de l'insuline aspartate/aspartate cristallisée.....	83
Tableau 13. Evolution de la valeur moyenne de la glycémie en fonction du type d'insuline..	84
Tableau 14. Pourcentage de variation de la glycémie en fonction du taux initial.	85

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

DEDICACES

LISTE DES ABREVIATION.....	i
LISTE DES TABLEAU.....	ii
LISTE DES FIGURES	iii
TABLE DES MATIERES.....	iv
INTRODUCTION ET OBJECTIFS	01

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LA BIOTECHNOLOGIE ET INSULINE

1. Historique de la biotechnologie.....	03
2. Définitions	04
2.1. La biotechnologie	04
2.2. Bio-médicament.....	04
3. Catégories de produits biologiques.....	04
4. Technologie de développement des médicaments issue de la biotechnologie.....	05
4.1. Identification protéique.....	05
4.2. Isolation du gène	06
4.3. Clonage et expression	06
4.4. Augmentation de l'échelle de fabrication (<i>scale-up</i>)	07
4.4.1. Phase d'inoculum	07
4.4.2. Phase de fermentation	07
4.4.3. Purification.....	08
4.4.4. Formulation	08
4.5. Contrôle qualité.....	09
5. Insuline.....	09

5.1 Structure de l'insuline.....	09
5.2 Biosynthèse.....	10
5.3 Physiologie de l'insuline.....	12
5.3.1 Sécrétion.....	12
5.3.2 Distribution.....	12
5.3.3 Catabolisme.....	13
5.3.4 Mécanisme d'action.....	13
5.3.5 Action physiologique.....	14
5.4 Utilisations thérapeutiques.....	15
5.4.1 Les différentes présentations de l'insuline	15
5.4.2 Indication.....	17
5.4.3 Schémas thérapeutiques.....	18
5.5 Les effets indésirables	19
5.6 Interactions médicamenteuses et les précautions d'emploi de l'insuline.....	19

CHAPITRE II : PRODUCTION ET CONTROLE DE L'INSULINE

1. Histoire de la production de l'insuline	22
2. Production moderne de l'insuline.....	22
2.1. Matériels utilisés	22
2.2. Les différents processus utilisés.....	23
2.2.1. Production a partir des peptides A et B	23
2.2.2. Production à partir de la pro-insuline.....	25
2.2.3. Production des analogues de l'insuline.....	25
3. Contrôle de l'insuline.....	26
3.1 Contrôle des matières premières.....	27

3.1.1 Matériel génétique.....	27
3.1.2 Banque cellulaire.....	27
3.2 Contrôle du procédé de fabrication.....	28
3.2.1 Contrôles en ligne (monitoring)	28
3.2.2 Contrôle hors ligne (échantillonnage).....	28
3.3 Contrôle de la substance active.....	28
3.3.1 Test d'identité	28
3.3.2 Tests de pureté.....	29
3.3.3 Tests d'activité.....	29
3.3.4 Tests de sécurité.....	29
3.4 Contrôle du produit fini.....	29
3.4.1 Dosage de l'insuline.....	30
3.4.2 Dosage des impuretés de masse moléculaire supérieure à celle de l'insuline.....	30
3.4.3 Dosage des protéines apparentées.....	30
3.4.4 Détermination de l'immunoréactivité de type pro insuline.....	30
3.4.5 Détermination de la teneur en zinc.....	30
3.4.6 Perte a la dessiccation.....	30
3.4.7 Cendres sulfuriques.....	30
3.4.8 Recherche d'endotoxines bactériennes.....	30

CHAPITRE III: FORMAT CTD (DOCUMENT TECHNIQUE COMMUN) ET EXIGENCE POUR LES PRODUITS ISSUS DE LA BIOTECHNOLOGIE

1. Introduction.....	32
2. Définition CTD.....	32
3. Intérêt du CTD.....	32
4. Contenu du CTD.....	33

4.1 Module 1 : Information administrative régionale.....	33
4.2 Module 2 : résumés.....	34
4.3 Module 3.....	35
4.4. Module 4 : Informations non-clinique.....	38
4.5 Module 5 : informations cliniques.....	38

PARTIE PRATIQUE

Présentation de terrain de pratique.....	41
--	----

I. MATERIELS ET METHODES.....43

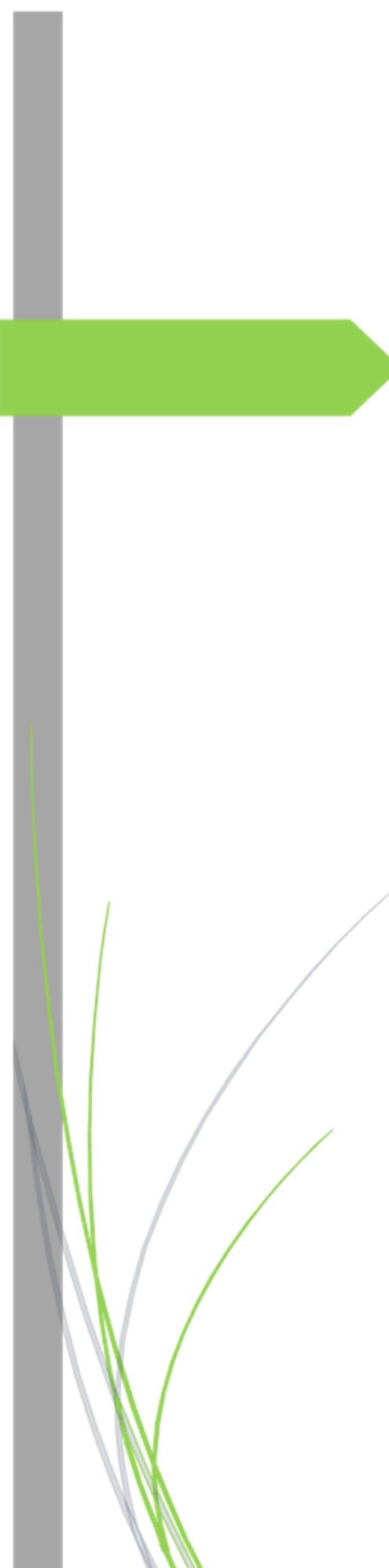
1. Différence réglementaire entre médicaments biologiques et médicaments chimiques.....	43
1.1. Notion de brevet.....	43
1.2. Complexité de structure.....	44
1.3. Activité biologique.....	44
1.4. Notion de génériques et de biosimilaires.....	44
1.5. Concept de biosimilarité et exercice de comparabilité.....	45
1.6. Notion d'immunogénicité et de toxicité.....	46
1.7. Etudes de stabilité.....	46
2. Caractéristiques des produits a testés.....	47
2.1. Novomix 30.....	47
2.1.1. Présentation quantitative et qualitative.....	47
2.1.2. Forme pharmaceutique.....	47
2.1.3. Informations cliniques.....	47
2.1.3.1. Indications thérapeutiques.....	47
2.1.3.2. Posologie et mode d'administration.....	47
2.1.3.2.1. Posologie.....	47
2.1.3.2.2. Mode d'administration.....	47
2.1.3.3. Contre-indications.....	48
2.1.3.4. Les effets indésirables.....	48

2.1.4. Propriétés pharmacologiques	48
2.1.4.1. Propriétés pharmacodynamiques	48
2.1.4.1.1. Classe pharmaco-thérapeutique.....	48
2.1.4.1.2. Mécanisme d'action et effets pharmacodynamiques.....	48
2.1.4.2. Propriétés pharmacocinétiques.....	49
2.1.5. Données Pharmaceutiques.....	49
2.2. Levemir FlexPen.....	49
2.2.1. Présentation quantitative et qualitative.....	49
2.2.2. Forme pharmaceutique.....	50
2.2.3. Informations cliniques.....	50
2.2.3.1. Indications thérapeutiques.....	50
2.2.3.2 Posologie et mode d'administration.....	50
2.2.3.2.1 Posologie.....	50
2.2.3.2.2. Mode d'administration.....	50
2.2.3.2.3. Contre-indications.....	51
2.2.3.2.4. Les effets indésirables.....	51
2.2.4. Propriétés pharmacologiques.....	51
2.2.4.1. Propriétés pharmacodynamiques.....	51
2.2.4.1.1. Classe pharmaco-thérapeutique.....	51
2.2.4.1.2. Mécanisme d'action et effets pharmacodynamiques.....	51
2.2.4.2. Propriétés pharmacocinétiques.....	52
2.2.4.2.1. Absorption.....	52
2.2.4.2.2. Distribution.....	52
2.2.4.2.3. Biotransformation.....	53
2.2.4.2.4. Élimination.....	53
3. Evaluation toxicologique de l'insuline.....	54
3.1. ESSAI DE LA TOXICITE ANORMALE DE L'INSULINE.....	54

3.1.1 Objectif.....	54
3.1.2 Principe	54
3.1.3 Locaux et conditions ambiantes	54
3.1.4 Equipements.....	54
3.1.5 Consommables.....	55
3.1.6 Réactifs.....	55
3.1.6.1 Réactifs chimiques.....	55
3.1.6.2 Réactifs biologiques.....	55
3.1.7 Le mode opératoire.....	55
3.1.7.1 Préparation des animaux.....	55
3.1.7.2 Préparation des solutions d'insuline.....	56
3.1.7.3 Les volumes des solutions à injecter.....	56
3.1.7.4 Administrations des solutions.....	56
3.2. Recherche d'endotoxines bactériennes : méthode au gel point final.....	59
3.2.1. Objectif.....	59
3.2.2. C'est quoi une endotoxine bactérienne.....	59
3.2.3. Principe.....	59
3.2.4. Locaux et conditions ambiantes.....	60
3.2.5. Equipement.....	60
3.2.6. Consommables.....	60
3.2.7. Réactifs spéciaux.....	61
3.2.8. Mode opératoire.....	62
3.2.8.1 Validation de la sensibilité du lysat.....	62
3.2.8.1.1. Reconstitution du lysat.....	62
3.2.8.1.2. Reconstitution de l'endotoxine.....	62
3.2.8.1.3. Préparation de la gamme d'endotoxines dans l'eau LAL.....	63
3.2.8.1.4. Résultat.....	63

3.2.8.2. Essai final : contrôle des produits à tester.....	64
3.2.8.2. Essai final : contrôle des produits à tester.....	64
3.2.8.2.1 Reconstitution du lysat.....	65
3.2.8.2.2. Reconstitution de l'endotoxine.....	65
3.2.8.2.3. Préparation des échantillons.....	65
3.2.8.2.4. Caractérisation des échantillons.....	66
3.2.8.2.5. Calcul de la dilution maximale significative.....	66
3.2.8.2.6. Préparation de la dilution	67
3.2.8.2.7. Mesure du PH.....	67
3.2.8.2.8. Préparation de la surcharge.....	67
3.2.8.3. Essai proprement dit.....	67
4.Evaluation de l'activité hypoglycémiante de l'insuline.....	71
4.1 Introduction	71
4.2 Objectifs	71
4.3 Principe	71
4.4. Locaux et conditions ambiantes.....	71
4.5. Matériels.....	71
4.5.1 Equipements	71
4.5.2 Consommables	72
4.5.3 Réactifs.....	72
4.6. Mode opératoire.....	73
4.6.1. Préparation des animaux.....	73
4.6.2. Préparation des solutions d'insuline.....	73
4.6.3. Protocole.....	76
4.7. Expression des résultats et analyse statistiques.....	77
4.7.1. L'analyse de la variance d'ANOVA.....	77
4.7.1.1. Définition du test d'ANOVA	78

4.7.1.2. Erreur standard.....	79
4.7.2. Calcul du pourcentage de variation de la glycémie en fonction du taux initial.....	79
II. LES RESULTATS.....	80
1. Test de toxicité anormale.....	80
2. Recherche d'endotoxines bactérienne.....	81
2.1. Résultat de la validation initiale.....	81
2.1.1. Détermination du point final.....	81
2.2. Résultats de l'insuline détemir.....	82
2.2.1. Mesure du pH.....	82
2.2.2. Résultats finales.....	82
2.3. Résultats de l'insuline aspartate/aspartate cristallisée.....	83
2.3.1. Mesure du pH	83
2.3.2. Résultats finales.....	83
3. activité hypoglycémique de l'insuline.....	84
III. DISCUSSION GENERALE.....	88
1. L'évaluation de la toxicité anormale.....	88
2. La recherche des endotoxines bactériennes.....	88
2.1. Résultats de l'insuline détemir.....	88
2.2. Résultats de l'insuline aspartate/aspartate cristallisé.....	89
3. L'évaluation de l'activité hypoglycémiant de l'insuline.....	90
CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATION.....	92
ANNEXE I	
ANNEXE II	
ANNEXE III	
REFERENCE	



INTRODUCTION ET OBJECTIFS

INTRODUCTION ET OBJECTIFS :

La biotechnologie a engendré une immense vague dans les sciences biologiques et représente une interface importante entre les sciences fondamentales et appliquées, où la transformation graduelle et subtile de la science en technologie peut en être témoin.

La biotechnologie est l'application de nos connaissances des processus biologiques pour créer des applications bénéfiques dans la médecine, l'agriculture, l'alimentation, l'environnement et d'autres domaines. Elle gagne en importance grâce à sa capacité à tirer parti des processus de la nature pour répondre aux besoins spécifiques des humains, des animaux et de la santé de la planète. [1] [2]

Les biomédicaments sont parmi les réalisations les plus sophistiquées et élégantes de la science moderne révolutionnant ainsi le domaine médical.

Non seulement, Ils traitent les maladies avec une grande efficacité et avec peu d'effets secondaires, mais les archétypes de traitement existants évoluent aussi et deviennent de plus en plus sophistiqués, et la recherche continue donne des produits entièrement nouveaux. Des concepts radicalement nouveaux font leur apparition sur le marché, comme la thérapie cellulaire, qui est utilisée pour traiter le cancer, et, un peu plus loin, les thérapies géniques, qui offrent des promesses encore plus étonnantes de médecine régénératrice ou de rémission. [1]

L'opportunité dans les produits biopharmaceutiques est grande et augmente très rapidement pour être ignorée. Aujourd'hui, les produits biopharmaceutiques génèrent des revenus mondiaux de 163 milliards de dollars, soit environ 20% du marché pharmaceutique [2]. C'est de loin la partie de l'industrie qui connaît la croissance la plus rapide ; le taux de croissance annuel actuel du biopharmaceutique de plus de 8% est le double de celui de l'industrie conventionnelle, et la croissance devrait continuer à ce rythme dans un avenir prévisible. [2]

Le monde d'aujourd'hui compte plus 425 millions de diabétiques, et leur nombre pourrait passer à 629 millions en 2045. Face à ce fléau, les industriels se sont penchés vers la production de l'insuline et de ses analogues offrant ainsi un traitement de choix à cette maladie. [3]

Devant cette expansion de la biotechnologie, les organismes règlementaires ont vu nécessaire d'élaborer des guidelines et des essais de contrôle de qualité permettant de réguler cet essor.

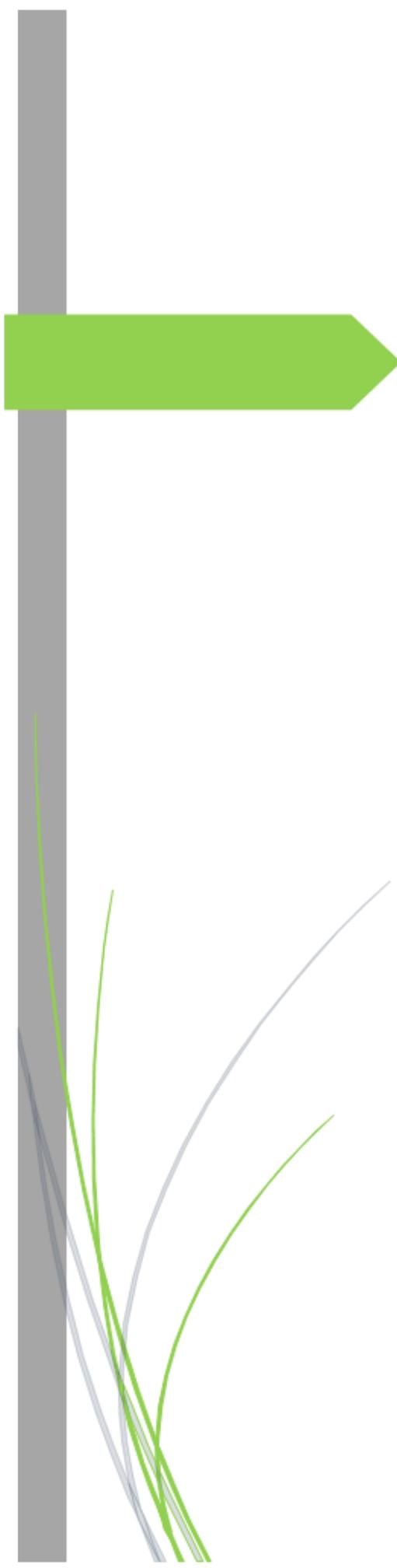
Le travail présenté ici a pour objectifs, d'une part, de connaître l'importance de la biotechnologie moderne et de l'insuline, et d'autre part, d'avoir un aperçu sur la méthode dont ces biomédicaments sont contrôlés sur le plan réglementaire et sur le plan contrôle de qualité.

De ce fait, la première partie de notre travail sera consacré à la façon dont les biomédicaments sont produits ainsi que les contrôles subis par eux avant leur libération. On s'intéressera aussi, au rôle physiologique de l'insuline et au contenu du dossier technique commun.

La deuxième partie sera axée sur deux points :

Le premier point portera sur les différences observées au niveau du dossier technique commun entre les biomédicaments et les médicaments d'origine chimique ;

Quant au second point, il portera en premier lieu, sur le contrôle toxicologique de deux analogues d'insuline : l'insuline détemir et l'insuline aspartate/aspartate cristallisée, et ce, par la réalisation du test de toxicité anormale et du test de la recherche d'endotoxines bactériennes. En deuxième lieu, il s'appuiera sur le contrôle pharmacologique de ces analogues choisis par la méthode in vivo sur des souris.



PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LA BIOTECHNOLOGIE ET INSULINE

1. Histoire de la biotechnologie :

Le terme biotechnologie a été utilisé pour la première fois par Karl Erkey, un ingénieur hongrois, en 1919. [4]

Certains historiens de la science diront que les origines de la biotechnologie remontent à 4000-8000 ans au sumérien, cultures égyptienne et chinoise. La fermentation est un processus biologique de base ancestral par lequel un organisme vivant, une levure, réagira avec les glucides, comme le blé, dans un récipient pour produire de l'alcool. Ce produit sumérien était la bière. Cette biotechnologie de base (fermentation) était également utilisée aussi pour la préparation du pain et du fromage, des aliments de base, et plus tardivement du vin au cours des millénaires.

Après la fin de la seconde guerre mondiale, des découvertes très importantes ont été signalées, qui ont ouvert la voie à la biotechnologie moderne et à son statut actuel.

L'ère moderne de la biotechnologie est censée avoir commencé dans les années 1950s, avec la découverte par Watson et Crick de la construction en trois dimensions (3D) de la double hélice d'ADN et les paires appariées de quatre acide nucléique (adénine, guanine, cytosine et thymidine) dans une séquence spécifique. Plusieurs découvertes clés en biologie entre les années 1940s-1960s ont étayé la biotechnologie, à savoir, le code génétique qui est universel dans la nature parmi tous les êtres vivants et que l'ADN était responsable du port de l'information génétique. [5]

Certaines découvertes importantes liées à la biotechnologie ont été montrées à la figure 1.

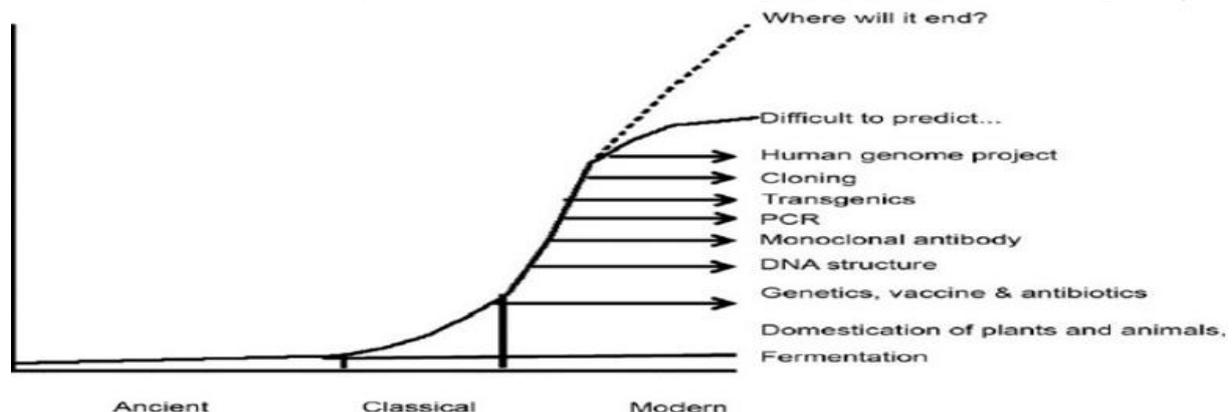


Figure1: histoire de développement de la biotechnologie

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3178936/figure/F1/>

En 1982, fut synthétisé le premier produit issu de la biotechnologie moderne par L'américain Herbert Boyer et cofondateur de Genentech en créant une version synthétique d'un gène codant pour une protéine et en l'introduisant dans la bactérie *Escherichia coli*. Cette dernière produisant par la suite cette protéine qui n'est tout autre que l'insuline. [4]

2. Définitions

2.1. Biotechnologie :

Dans un sens plus large, la "biotechnologie" peut être définie comme l'utilisation d'organismes ou d'enzymes pour la production à grande échelle de substances utiles non seulement agricoles, mais aussi alimentaires, science de l'environnement et dans le domaine des composés médicinaux, des vaccins et des diagnostics. [6]

Fait intéressant, Robbers et al. (1996) ont inventé une terminologie tout à fait nouvelle appelée pharmaco biotechnologie afin de se référer spécifiquement à la large application de la biotechnologie au développement des produits pharmaceutiques ou de substances pharmaceutiquement actives. [6]

2.2. Bio médicament :

Un produit biopharmaceutique, également connu sous le nom de produit biologique est un produit pharmaceutique fabriqué, extrait ou semi-synthétisé à partir de sources biologiques. Différent des produits pharmaceutiques totalement synthétisés, ils peuvent être composés de sucres, de protéines ou d'acides nucléiques ou d'une combinaison de ces substances. Ils peuvent également être des entités vivantes, telles que des cellules et des tissus. [7]

3. CATÉGORIES DE PRODUITS BIOLOGIQUES :

Plus de 60 produits biologiques ont été commercialisés par plus de 30 entreprises aux États-Unis de 1982 à 1999.

Au cours des six dernières années, 80 autres produits ont été commercialisés.

Dans de nombreuses maladies, les produits biologiques sont souvent été des percées majeures offrant le premier traitement où rien auparavant n'était efficace pour les maladies graves, par exemple la bêta-interféron pour la sclérose en plaques. Maintenant nous avons des produits biologiques dans plus de onze catégories. Le tableau 2 présente un aperçu statistique du nombre de molécules biologiques, produits, indications, et les entreprises. [5]

Tableau 1 : Produits biologiques commercialisés

Types of products	Molécules	Products	Indications	Companies
Hormones	14	32	15	13
Antibodies (Mabs)	19	18	18	21
Enzymes	15	15	16	12
GFs	7	8	12	4
Interferons	10	12	10	8
Blood factors	4	4	4	5
ILs	3	3	4	4
Vaccines	5	6	4	3
Liposomes	5	5	5	5
Tissues and cells	9	19	19	20
Blood products; natural extracts	15	18	21	16
Other	17	17	18	18
Total	123	157	121	63

Encyclopedia of Pharmaceutical Technology DOI: 10.1081/E-EPT-120041180 Copyright # 2007 by Informa Healthcare USA, Inc. All rights reserved.

4. Technologie de développement des médicaments issue de la biotechnologie :

Exemple des médicaments de nature protéique :

La technologie prédominante en biotechnologie depuis les années 1980 à ce jour reste la technologie r-ADN, qui a été le processus utilisé pour créer plus de 60 produits. La notion de base est la fabrication de protéines humaines dans les systèmes vivants non humains [2]. Elle comprend principalement les cinq étapes suivantes :

4.1 Identification protéique :

Les produits issus de la biotechnologie ont été principalement des protéines qui ont été identifiées dans le corps humain pour leurs actions bénéfiques ou délétères.

Ceci implique qu'il faut trouver une protéine responsable de certains effets biologiques dans le corps humain qui a un potentiel thérapeutique. Cette dernière doit être isolée de son milieu normal, généralement un fluide corporel ou cellule. La structure complète de la

protéine et ses fonctions seront déterminées par la suite. Exemple : insuline (voire titre 5-1 : structure de l'insuline). [5]

4.2 Isolation du gène :

Elle implique l'un des trois mécanismes ci-dessous :

-Premièrement, la séquence aminoacide complète de la protéine est souvent connue ainsi que les triplets d'acide nucléique qui codent pour les acides aminés. Par conséquent, on peut construire de nombreuses combinaisons de ces triplets qui peuvent être des représentations génétiques du gène cible pour la protéine cible, dont l'un sera identifié à travers le criblage (screening) comme le gène correct avec la capacité pour produire la protéine cible. [5]

-Deuxièmement, on pourrait être capable de trouver la cellule humaine qui produit la protéine cible. Dans cette cellule, on pourrait isoler l'ARNm qui est responsable du processus de traduction pour produire la protéine cible. L'enzyme virale, la transcriptase inverse, est capable de créer la ADN cible complémentaire à partir de cet ARNm spécifique. Cette méthode a été utilisée pour trouver le gène de l'insuline qui a conduit à des produits commercialisés. [5]

-Troisièmement, le gène humain pourrait être isolé du génome en utilisant des sondes d'acide nucléique.

Dans cette méthode, plusieurs peptides dans la séquence d'acides aminés de la protéine sont identifiables. En utilisant le code des triplets d'acides nucléiques, on pourrait construire des combinaisons d'acides nucléiques spécifiques(sondes) pour chaque peptide. Ensuite, les chromosomes seront cassés en milliers de morceaux d'ADN. Grâce à de nombreuses expériences en série, on essaierait de faire correspondre la première sonde d'acide nucléique au mélange d'ADN, ce qui crée un sous-ensemble de ADN correspondant (des centaines ou des milliers). Dans une autre série d'expériences, une seconde sonde d'acide nucléique différente pour un peptide différent est appariée contre ce sous-ensemble d'ADN pour d'autres correspondances. Les appariements se produisent, donnant une série de gènes possibles. Chaque gène doit être évalué par des analyses génétiques pour assurer la production de la protéine correcte, qui sont ensuite testés pour être sûr que la protéine a les caractéristiques structurales et propriétés pharmacologiques de la protéine ciblée et naturelle. Le gène pour la protéine, l'épôïétine alfa pour l'anémie, a été découvert par cette méthode laborieuse. [5]

4.3 Clonage et expression :

Clonage est la reproduction du gène humain cible dans une cellule non humaine.

L'expression est la production de la protéine humaine cible par une cellule non humaine contenant le gène humain. [5]

Ces processus nécessitent un vecteur pour ADN, de sorte que le gène peut être porté dans une cellule hôte. Un plasmide bactérien est une pièce circulaire ADN qui est transférable entre les cellules (par conséquent, un porteur), qui accepte l'insertion d'un gène humain, et permet l'activation du gène humain. Les plasmides sont en outre manipulés pour maximiser leur fonction avec l'ajout de promoteur, amplificateur et opérateur de séquences d'ADN. [5]

Le plasmide doit être ouvert par des enzymes uniques (endonucléases de restriction bactériennes), dont chacune est hautement spécifique à une certaine séquence d'acide nucléique pour correspondre à une extrémité terminale du gène humain. [5]

Sous l'influence d'une enzyme ligase, on obtiendrait une molécule d'ADN recombinée contenant un gène humain inséré dans un plasmide bactérien. Ensuite, la molécule r-ADN est inséré dans une cellule hôte, qui servira à produire la protéine humaine du gène humain qu'elle porte. [5]

Les cellules hôtes peuvent être des bactéries, généralement E. coli, des levures, cellules ovariennes d'hamster chinois ou cellules de rein de hamster. (Voir annexe 1 pour plus d'information).

4.4 Augmentation de l'échelle de fabrication (*scale-up*)

4.4.1 Phase d'inoculum :

Elle implique l'utilisation de cellules filles de la nouvelle cellule hôte qui était préalablement stockée et congelée à -70° C (banque de cellule). Les cellules filles sont cultivées dans des milieux spécifiques dans des flacons pour une croissance normale.

Le milieu de croissance est un mélange unique et spécifique de minéraux, de composés et des nutriments pour améliorer la viabilité cellulaire (durée de vie) in vitro et la capacité fonctionnelle des cellules pour produire des protéines (maximiser le rendement). [5]

4.4.2 Phase de fermentation :

La phase de culture cellulaire implique l'inoculation de plusieurs conteneurs avec des cellules de la phase d'inoculum auxquelles on ajoute des facteurs de croissance appropriés.

Les cellules hôtes vont entamer la production des protéines, soit intracellulaire dans des vacuoles pour la plupart des cellules hôtes bactériennes ou extra cellulaires dans le milieu de culture pour les cellules de mammifères.

L'alimentation des cellules hôtes et l'élimination des déchets dans le milieu doivent être fait périodiquement pour maintenir la viabilité de l'hôte et la productivité. [5]

4.4.3 Purification :

La purification de la protéine varie entre système bactérien ou mammaire

Pour les bactéries, les cellules sont enlevées du liquide dans les fermenteurs par centrifugation pour donner une pâte cellulaire, qui est à nouveau centrifugée pour faire sortir les protéines. Le mélange de protéines passe alors par un processus d'extraction, souvent par HPLC pour séparer la cible protéine de toutes les autres protéines.

Pour les cellules de mammifères, le milieu de culture contient les protéines, qui étaient sécrétés extra cellulaires par les cellules mammifères, et sont périodiquement collectés. Le processus de purification étant le même que pour les cellules bactériennes.

On obtient à la fin une protéine en vrac pure. [5]

4.4.4 Formulation

La phase finale est la formulation, dans laquelle un diluant est choisi pour la protéine, en incorporant le meilleur mélange de tampons, stabilisants et minéraux pour atteindre la meilleure stabilité des protéines, durée de conservation maximale ainsi qu'une bonne tolérance et efficacité pour les patients. Eau stérile, solution saline normale et dextrose 5% dans l'eau sont les trois diluants communs. La formulation des protéines est complexe par la nature délicate générale des protéines et les nombreux processus dégradants qui peuvent survenir avec eux (Tableau 2). [5]

Tableau 2 : Stabilité/dégradation des produits biologique

Precipitation
 Clumping/aggregation
 Cross-linkage
 Unlinkage (disulfide bridges)
 Amino acid mutation
 Glycosylation/deglycosylation
 Conjugation
 Amino acid deletions/additions
 Reduction
 Oxidation
 Folding/unfolding of protein
 Deamidation
 Proteolysis
 Protein inclusions
 Terminal amino acids variations

4.5 contrôle de qualité

Il représente la dernière étape de la technologie de l'ADN recombiné, il comprend le contrôle des composants, processus finaux et le processus de fabrication.

La fabrication est assez multiforme et complexe avec beaucoup de potentiel de contamination, d'altération, entraînant de mauvais résultats, par ex un produit détérioré, une protéine dégradée, contamination virale ou bactérienne, faible rendement, réaction immunitaire chez les patients, et même une protéine différente. [5]

La détérioration des protéines peut se produire à travers de nombreux processus, dont beaucoup sont répertoriés dans le tableau 1 ci-dessus.

Par conséquent, le contrôle de la qualité garantit l'intégrité du produit final grâce à une série étendue de tests, qui impliquent quatre domaines clés: matériel génétique (plasmides et gènes), produit protéique en vrac, produit final et processus de fabrication. [5]

5. Insuline :

5.1 Structure :

L'insuline humaine est un polypeptide de 6 000 Daltons composé de 2 chaînes reliées entre elles par deux ponts disulfures:

- Chaîne A : à caractère acide, renferme 21 aa dont le 1er est la glycine et le dernier l'asparagine. Elle renferme aussi un pont disulfure entre la cystéine 6 et la cystéine 11.

- Chaîne B : à caractère neutre, est constituée de 30 aa dont le 1er est la phénylalanine et le dernier la thréonine.

L'insuline humaine correspond à l'association de ces deux chaînes reliées par deux ponts disulfures situés sur des cystéines en A7-B7 et A20-B19. Cette liaison est essentielle pour la structure tertiaire de la protéine et pour la liaison à son récepteur. En biochimie, la structure tertiaire ou tridimensionnelle d'une molécule correspond au repliement dans l'espace de sa chaîne polypeptidique. Ce repliement va conférer à la protéine sa fonctionnalité, notamment par la formation d'un site actif pour les enzymes. [8]

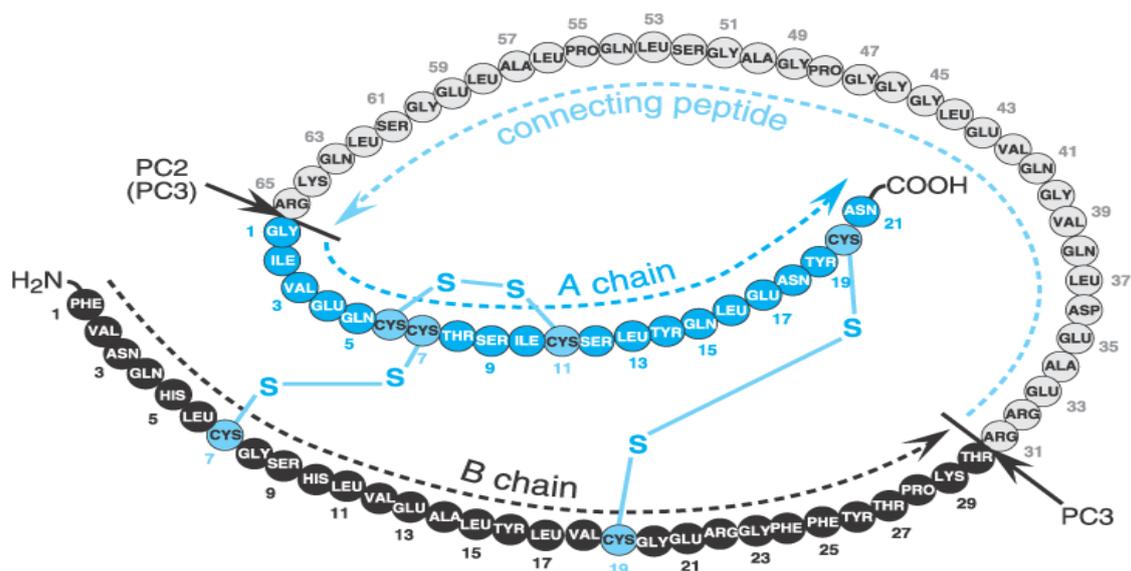


Figure 2 : Représentation schématique d'une molécule de pro-insuline et sa conversion en Insuline

PC : site de clivage protéique par des endopeptidases

(Goodman & Gilman's the Pharmacologic Basis of Therapeutics - 11th Ed. (2006))

Formule brute : C₂₅₇H₃₈₃N₆₅O₇₇S₆(isomères)

Masse molaire : 5807.57g.mol⁻¹

5.2 Biosynthèse :

Situés dans la partie exocrine du pancréas, les îlots de Langerhans, ne constituent que 1 à 2% de la masse totale de l'organe.

Ce sont de petits amas de cellules traversés par un très abondant réseau de capillaires sanguins dont le diamètre est compris en 30 et 300 micromètres. [9]

Les îlots de Langerhans sont constitués de trois principaux types de cellules endocrines. On y trouve en périphérie 20% de cellules A (ou alpha) à l'origine du glucagon, une hormone hyperglycémiant, et au centre 70% de cellules B (ou bêta) qui vont synthétiser l'insuline et enfin 5 à 10% de cellules D (ou delta) qui vont produire de la somatostatine. [9]

La synthèse d'insuline au sein des cellules bêta implique le clivage successif de ses deux précurseurs, les molécules de pré-pro-insuline et de pro-insuline.

Le gène codant pour la pré-pro-insuline est localisé au niveau du bras court du chromosome 11. [9]

Une fois synthétisée cette molécule de 98 acides aminés va rapidement subir un clivage enzymatique de 12 acides aminés pour devenir de la pro-insuline (voir figure1). Cette dernière, présente dans le réticulum endoplasmique va se replier sur elle-même afin de former par alignement les futures chaînes A et B, entre lesquelles vont apparaître des ponts disulfures qui seront ensuite reliées par le peptide-C (signifiant connecting peptide). De nombreuses molécules de pro-insuline vont ensuite être stockées sous forme de beta- granules, au niveau de l'appareil de Golgi. Celui-ci joue un rôle important dans le processus d'exocytose. Les bêta-granules contiennent aussi les enzymes protéolytiques à l'origine du clivage du peptide-C amenant à la formation de bêta-granules matures contenant une quantité équimolaire d'insuline et de peptide-C. Ce dernier a longtemps été utilisé comme marqueur de sécrétion d'insuline chez les patients diabétiques. [9]

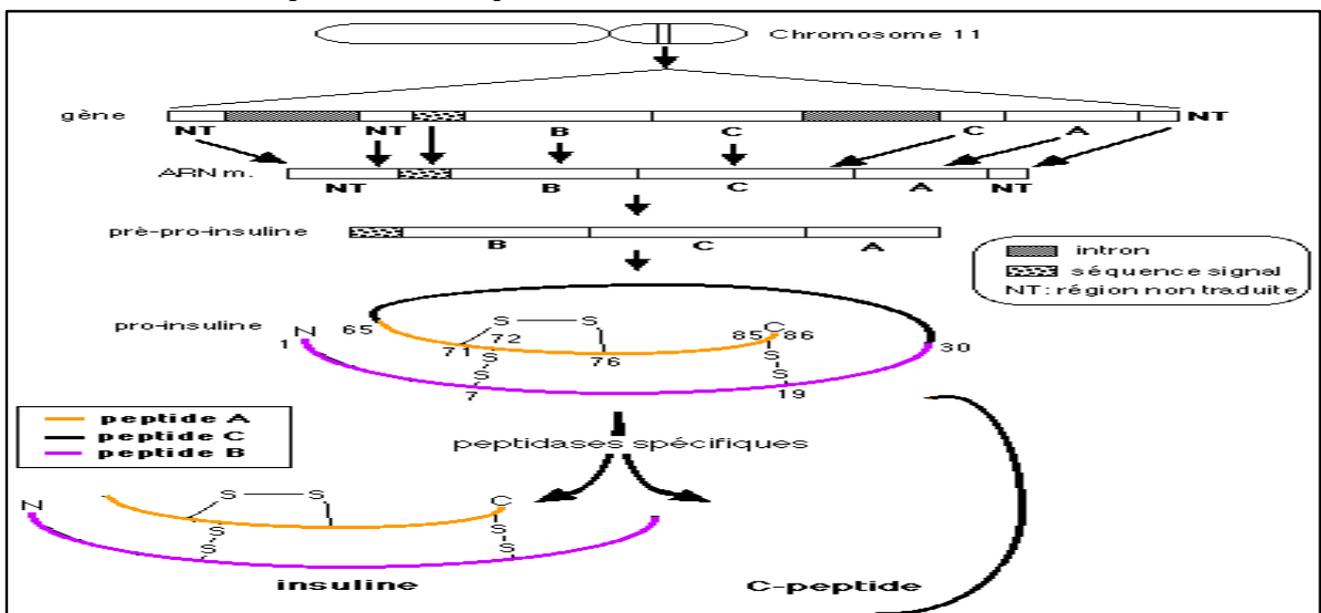


Figure 3 : Schéma de la synthèse la synthèse de l'insuline

Raynal, R. L'insuline. [Exobiologie] 14 avril 2002.

5.3 Physiologie de l'insuline :

5.3.1 Sécration:

Les bêta-granules matures forment un grand réservoir de stockage d'insuline, bien au-delà des besoins quotidiens.

L'insuline est libérée dans la circulation par exocytose, en fonction des fluctuations de la glycémie et de la concentration plasmatique des autres nutriments (acides aminés, acides gras, corps cétoniques).

Le glucose sanguin, en excès, va entrer dans la cellule bêta via le transporteur GLUT-1, entraînant l'activation de la glucokinase et ainsi l'augmentation de l'ATP (adénosine triphosphate) intracellulaire, le rapport ATP / ADP sera alors élevé ce qui conduira à la fermeture du canal potassique ATP-dépendant. Ceci va induire une dépolarisation de la membrane des cellules bêta et l'afflux d'ions calcium. L'insuline va alors être sécrétée. [10]

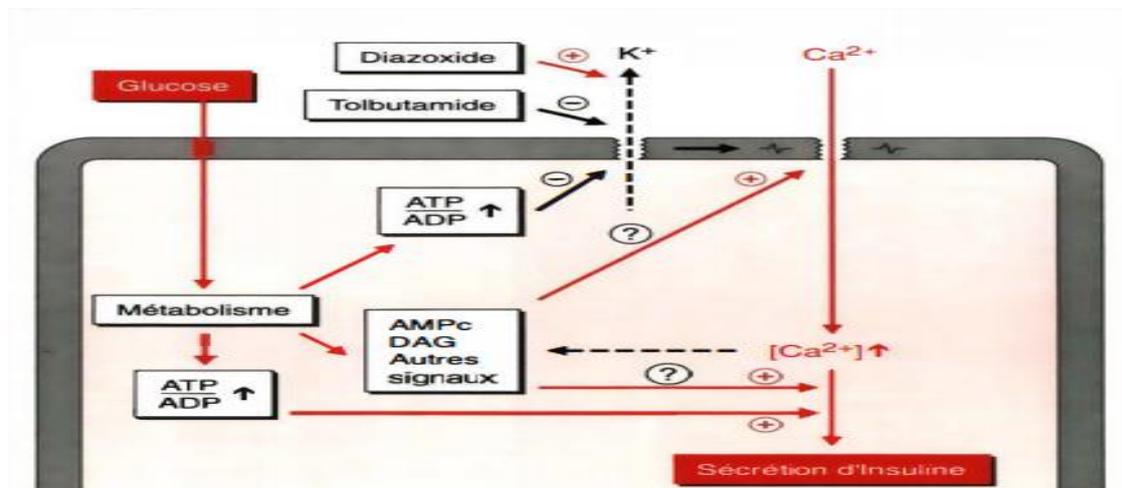


Figure 4: Représentation schématique des mécanismes de stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose.

http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/2443/1995_9_1235.pdf

5.3.2 distribution :

Après sécrétion pancréatique, la demi-vie de l'insuline dans le plasma est d'environ six minutes chez le sujet normal et chez le diabétique. Son volume de distribution est égal au volume du liquide extracellulaire, soit environ 20% du poids corporel.

C'est essentiellement la forme monomère de l'insuline qui diffuse dans les tissus. L'insuline peut traverser la barrière hémato-encéphalique grâce à des transporteurs. [11]

-La demi-vie de la pro-insuline est de 17min.

-La demi-vie du peptide C est de 30min.

5.3.3 Catabolisme

L'insuline circulante est éliminée par le foie lorsqu'elle passe à travers la circulation portale, ce qui signifie que les taux d'insuline portale sont plus élevés que ceux dans la circulation systémique.

Le rein est sérieusement responsable de la clairance de l'insuline dans la circulation systémique, sa clairance retardée peut causer des problèmes de contrôle chez les personnes atteintes d'une maladie rénale. Elle peut être dégradée dans d'autres tissus comme l'intestin.

L'enzyme responsable de la dégradation a été identifié pour la première fois dans les années 1960s. Elle a été nommée insulinase en anglais insulin degrading enzyme IDE. C'est une métallo peptidase de la famille de l'inverzincine. Son rôle est la dégradation de la chaîne β .

La PDI (proteine disulfide isomerase) clive les liaisons disulfures.

Enfin la dégradation des molécules d'insuline partiellement catabolisées sont achevées par les lysosomes. [11] [12]

5.3.4 Mécanisme d'action

En se fixant sur son récepteur, l'insuline active le domaine tyrosine kinase du récepteur à l'origine d'une cascade de réactions qui va notamment amener à la translocation des vésicules de stockage de GLUT-4. En effet, GLUT-4 est un transporteur de glucose qui, dans une cellule non stimulée ou quand la concentration en insuline est faible, est stocké dans des vésicules cytoplasmiques principalement au niveau des cellules hépatiques et musculaires. L'insuline va induire le mouvement des vésicules et leur fusion au niveau de la membrane plasmique. [11]

La concentration de ce transporteur insulino-dépendant dans la membrane va alors augmenter et le glucose pourra rentrer dans la cellule par diffusion passive. [11]

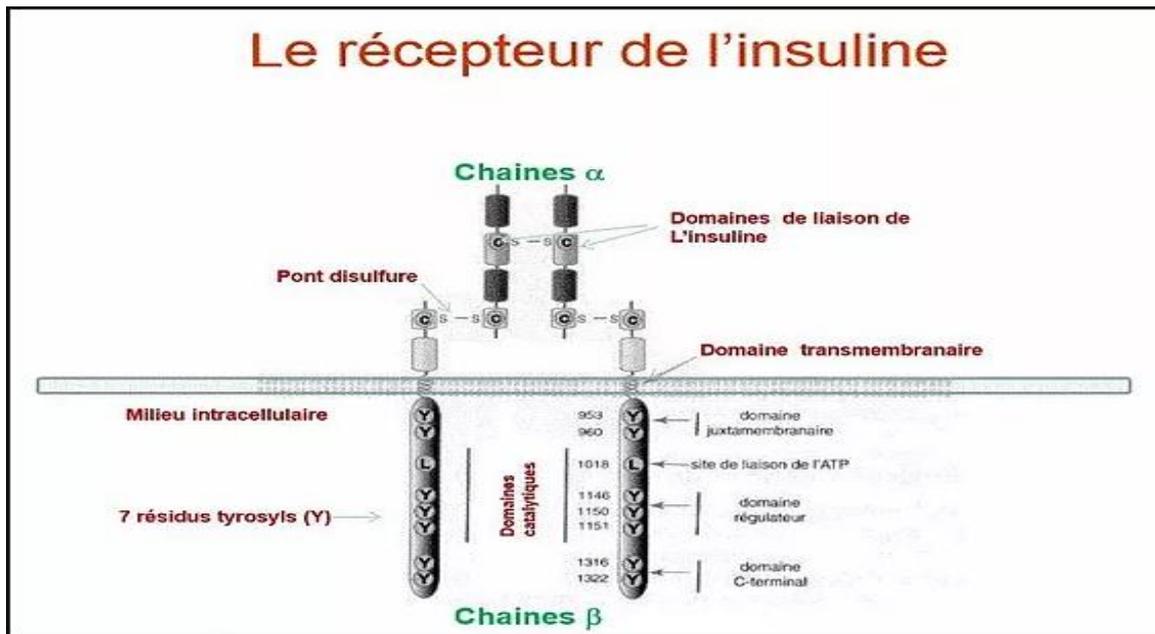


Figure 5 : Schéma du récepteur de l'insuline.

<http://www.ujf-grenoble.fr/>

5.3.5 Actions physiologiques :

L'effet anabolique est le principal effet de l'insuline sur les différents tissus de l'organisme :

✓ Métabolisme des glucides [12] :

-Stimule le stockage du glucose par le foie en stimulant la glycogénogenèse et la néoglucogenèse.

-Au niveau des muscles, elle favorise le transport membranaire du glucose ainsi que sa conversion en glycogène.

✓ Métabolisme lipidique [12] :

-Elle favorise la synthèse des acides gras dans le foie

-L'insuline inhibe la dégradation des graisses dans le tissu adipeux en inhibant la lipase intracellulaire qui hydrolyse les triglycérides pour libérer les acides gras.

✓ Autres effets notables de l'insuline [12]

-Stimule également l'absorption des acides aminés, contribuant à nouveau à son effet anabolisant global.

-L'insuline augmente également la perméabilité de nombreuses cellules aux ions potassium, magnésium et phosphate. L'effet sur le potassium est cliniquement important. Elle active les canaux sodium-potassium ATPase dans de nombreuses cellules, provoquant un flux de potassium dans les cellules.

-Favorise la croissance en stimulant la formation de la somatomédine et la somatotropine.

- ✓ Un effet sur le comportement alimentaire en agissant au niveau centrale par libération de neuropeptide Y(en cas de déficit) ce qui augmente l'appétit ou stimule la libération de leptine par les adipocyte(en cas d'excès) ce qui diminue l'appétit. [12]

5.4 Utilisations thérapeutiques

5.4.1 Les différentes présentations de l'insuline

Issus du génie génétique où un ou plusieurs acides aminés de la protéine normale sont remplacés, en vue de modifier la cinétique et la solubilité de l'insuline. [13]
La rapidité d'action peut être modulée par l'ajout d'excipients (protamine, zinc) permettant un relargage plus ou moins rapide de l'insuline dans le sang. [13]

Les différents conditionnements de l'insuline se présentent sous forme de flacons, stylos (pré-remplies jetables, rechargeables), cartouches pour stylos rechargeables et fioles. [13]

Les différents types d'insuline sont résumés dans le tableau 3

La figure 4 représente le début de l'action, le moment du pic et la durée d'action des différents types d'insuline.

Tableau 3 : récapitulatif des analogues de l'insuline

Type d'insuline	Composition	Début d'action	Durée d'action	Exemples de la nomenclature Algérienne
Ultra-rapide	- Analogues de l'insuline (lispro, aspart, glulisine) - Modifiées de façon à	10 à 20 min	3 à 5 h	- NovoRapid - Humalog®

	accélérer leur solubilisation et leur absorption.			- Apidra
Rapide	- Insuline solubilisée - Insuline humaine	30min	7 à 9 h	- Insuman® Rapid - Insuman® basal - Actrapid® HM
Mixte	- Insuline solubilisée + intermédiaire	30 min à 1h	12 à 19 h	- Insuman® Comb 25
	- Analogue insuline ultrarapide + intermédiaire	10 à 20 min	24 h	- Novomix®30
		15 à 45 min	8 a 24 h	- Humalog® Mix 25
		15 à 30 min	7 a 16 h	- Humalog® Mix 50
Intermédiaire	- Protamine + zinc	1 h à 1h30	14 à 24 h	- Insulatard®HM - Insuman® Basal
Lente	- Analogue de l'insuline → Ne pas mélanger à d'autres insulines	1 à 2 h (Absence de pic d'action)	24 h	- Lantus®
			20 a 24 h	- Levemir®
Ultra-lente	- Analogue de l'insuline - Formation de dépôt pour ralentir l'absorption de l'insuline	2 h (Absence de pic d'action)	42 h	- Non disponible

Ultra-lente combinée	<ul style="list-style-type: none"> - Analogue de l'insuline - Formation de dépôt pour ralentir l'absorption de l'insuline - Contient également du liraglutide (GLP-1) qui n'est pas une insuline 	2 h (Absence de pic d'action)	42 h	- Non disponible
----------------------	---	----------------------------------	------	-------------------------

(Hôpitaux universitaires Genève ; Informations sur les médicaments - Recommandations d'utilisation.) ([Http://www.pharmnet-dz.com/classepharmacologique.aspx?id=104&p=1](http://www.pharmnet-dz.com/classepharmacologique.aspx?id=104&p=1))

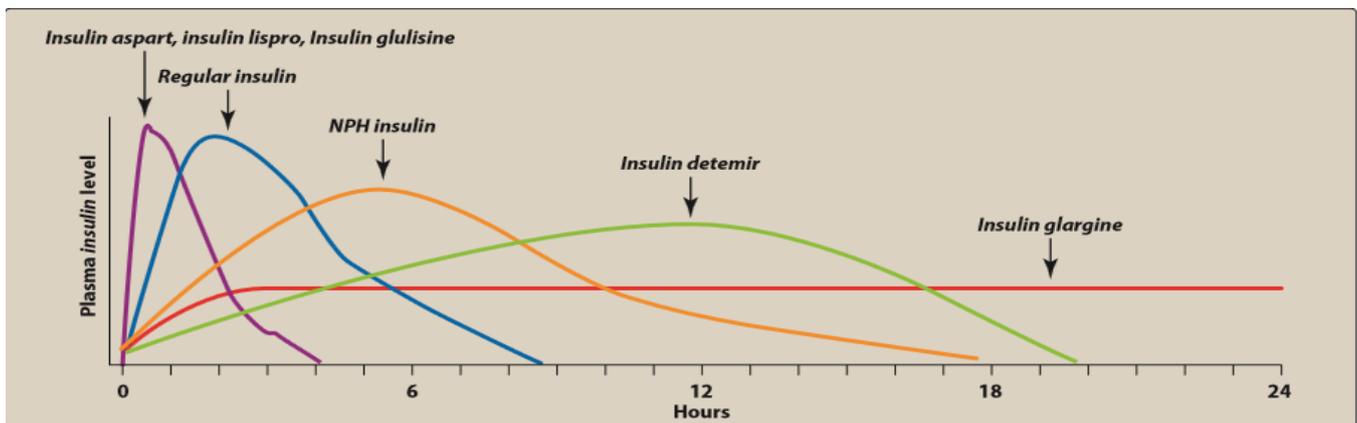


Figure 6: Début et durée d'action de l'insuline humaine et de ces analogues.
NPH = protamine neutre Hagedorn
(Lippincott pharmacology 6^{ème} Edition.)

5.4.2 Indications :

- Patients atteints de diabète de type 1, coma diabétique (acidocétose diabétique, syndrome hyperglycémiant hyperosmolaire) et la grossesse avec un diabète préexistant doivent être sous insulinothérapie.
- Traitement du diabète secondaire à une pancréatectomie.

Une insulinothérapie est également recommandée lorsque les patients sont en infection sévère et au moment de procédure chirurgicale avec la gestion de l'ensemble du corps est nécessaire.

[14]

- L'insulinothérapie est également utilisée chez les patients diabétiques de type 2 lorsque le contrôle glycémique n'est pas favorable (régime alimentaire / exercice et les agents hypoglycémiants) ou lorsque la glucotoxicité doit être résolue chez ces patients. [15]

5.4.3 Schémas thérapeutiques :

Les schémas thérapeutiques reposent sur l'association de deux types d'insuline : lente et rapide, ce qui permettrait de reproduire les effets physiologiques de l'insuline.

✓ 5 injections :

- Insuline analogue lent (Lantus ou Levemir) ou NPH matin et soir + Analogue rapide (Humalog ou Novorapid ou Apidra) matin midi et soir, avant chaque repas
- Insuline NPH matin et soir + Insuline rapide (Actrapid ou Rapide) matin midi et soir

✓ 4 injections :

- Insuline analogue lent (Lantus ou Levemir) le soir au coucher + Analogue rapide (Humalog ou Novorapid ou Apidra) matin midi et soir, avant chaque repas
- Insuline NPH au coucher + Insuline rapide (Actrapid ou Rapide) matin, midi et soir
- Insuline lente type NPH matin et soir + Insuline rapide matin et soir
- Insuline Mix (mélange de rapide et de lente) matin et midi + Insuline rapide + insuline lente le soir

✓ 3 injections :

- Insuline Mix (mélange de rapide et de lente) matin, midi et soir
- Insuline rapide (Actrapid ou Rapide) matin et midi + Insuline Mix (mélange de rapide et de lente) le soir
- Insuline Mix (mélange de rapide et de lente) le matin et le soir + Insuline rapide (Humalog ou Novorapid ou Apidra) matin et midi

✓ 2 injections :

- Insuline lente matin et soir

✓ 1 injection :

- Insuline lente au coucher, comprimés dans la journée
- Insuline mix avant le dîner, comprimés dans la journée. [16]

5.5 Les effets indésirables :

- **Hypoglycémie:** les hypoglycémies nocturnes sont principalement attribuables à la dose de nuit. L'hypoglycémie post-absorbante est principalement due à un retard Hyper-insulinémie en utilisant une insuline de courte durée d'action régulière. Il peut être prévenu en prenant une collation, en réduisant la dose d'insuline régulière ou en substituant avec un analogue à action rapide. [17]
- **Gain de poids:** le gain de poids initial est dû à la correction de l'état catabolique. Plus tard, le patient prend du poids par la rétention liquidienne et la consommation excessive attribuable à L'hypoglycémies ou la peur des hypoglycémies imminentes. [17]
- **Réactions locales:** Allergie, infection, abcès au site d'injection et lipotrophie sont très rarement vus mais la lipohypertrophie est encore commun et est attribuable à l'injection répétée de l'insuline au même site. [17]
- **Anaphylaxie:** très rarement vu et nécessite une désensibilisation avec des doses progressivement croissantes d'insuline. [17]

5.6 Interactions médicamenteuses et les précautions d'emploi de l'insuline:

Tableau 4 : les interactions médicamenteuses de l'insuline et les mesures à prendre.

+	Effet	Mesure à prendre
Consommation D'ALCOOL	Augmentation de la réaction hypoglycémique (inhibition des réactions de compensation pouvant faciliter la survenue de coma hypoglycémique).	Association DECONSEILLEE Eviter la prise de boissons alcoolisées et de médicaments contenant de l'alcool.
ANALOGUES DE LA SOMATOSTATINE	Risque d'hypoglycémie ou d'hyperglycémie : diminution	Précaution d'emploi Prévenir le patient du risque

	ou augmentation des besoins en insuline, par diminution ou augmentation de la sécrétion de glucagon endogène.	d'hypoglycémie ou d'hyperglycémie, renforcer l'autosurveillance glycémique et adapter si besoin la posologie de l'insuline pendant le traitement par l'octréotide ou le lanréotide.
BÊTA-2 MIMÉTIQUES	Elévation de la glycémie par le bêta-2 mimétique.	Précaution d'emploi Renforcer la surveillance sanguine et urinaire.
BÊTA-BLOQUANTS (SAUF ESMOLOL)	Tous les bêtabloquants peuvent masquer certains symptômes de l'hypoglycémie : palpitations et tachycardie.	Précaution d'emploi Prévenir le patient et renforcer, surtout en début de traitement, l'autosurveillance glycémique.
BÊTA-BLOQUANTS DANS L'INSUFFISANCE CARDIAQUE	Tous les bêtabloquants peuvent masquer certains symptômes de l'hypoglycémie : palpitations et tachycardie.	Précaution d'emploi Prévenir le patient et renforcer, surtout en début de traitement, l'autosurveillance glycémique.
CHLORPROMAZINE	A fortes posologies (100 mg par jour de chlorpromazine) : élévation de la glycémie (diminution de la libération de l'insuline).	Précaution d'emploi Prévenir le patient et renforcer l'autosurveillance glycémique. Adapter éventuellement la posologie de l'insuline pendant le traitement par le neuroleptique et après son arrêt
DANAZOL	Effet diabétogène du danazol	Association DECONSEILLÉE Si l'association ne peut être évitée, prévenir le patient et renforcer l'autosurveillance glycémique. Adapter éventuellement la posologie de l'insuline pendant le traitement par le danazol et après son arrêt.
INHIBITEURS DE	L'utilisation des IEC peut	Précaution d'emploi

<p>L'ENZYME DE CONVERSION</p>	<p>entraîner une majoration de l'effet hypoglycémiant chez le diabétique traité par insuline. La survenue de malaises hypoglycémiques semble exceptionnelle (amélioration de la tolérance au glucose qui aurait pour conséquence une réduction des besoins en insuline).</p>	<p>Renforcer l'autosurveillance glycémique.</p>
--	--	---

Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé : thesaurus des interactions médicamenteuses

Chapitre II : Production et contrôle de l'insuline

1. Histoire de la production de l'insuline :

La production de l'insuline a commencé en 1921, lorsque les scientifiques canadiens Frederick G. Banting et Charles H. Best ont réussi à purifier l'insuline du pancréas d'un chien. Au fil des années, les scientifiques ont constamment amélioré la production d'insuline.

En 1936, des chercheurs ont trouvé un moyen de produire de l'insuline avec une libération plus lente dans le sang. Ils ont ajouté une protéine trouvée dans le sperme de poisson, la protamine, dont le corps la décompose lentement, une injection a duré 36 heures. Une autre percée est survenue en 1950 lorsque les chercheurs ont produit un type d'insuline qui agissait un peu plus vite et ne restait pas dans le sang aussi longtemps.

Dans les années 1970, les chercheurs ont commencé à essayer de produire une insuline qui imitait mieux le fonctionnement de l'insuline naturelle du corps: libérer une petite quantité d'insuline toute la journée avec des poussées qui se produisaient au moment des repas.

Pourtant, la méthode de production de base est restée la même pendant des décennies. L'insuline a été extraite du pancréas des bovins et des porcs et purifiée. La structure chimique de l'insuline chez ces animaux n'était que légèrement différente de l'insuline humaine. Puis, au début des années 1980, la biotechnologie a révolutionné la synthèse de l'insuline.

En 1982, la société Eli Lilly a produit une insuline humaine qui est devenue le premier produit pharmaceutique génétiquement modifié approuvé. [11]

2. Production moderne de l'insuline :

2.1. Matériels utilisés :

- La culture maternelle - *Escherichia coli*
- Chambre UV
- gène humain
- Enzymes, antibiotiques et amorce
- PCR - clonage

- Flacons de fermentation - croissance de la culture bactérienne
- Milieu de culture / nutriments - bouillon LB
- Centrifugeuse - procédé de criblage
- Agitateur de culture
- Chromatographie et électrophorèse - isolement et criblage
- Cristallographie aux rayons X - processus d'isolation et de criblage. [19] [20]

2.2. Différents processus utilisés :

2.2.1 Production à partir des peptides A et B :

L'une des méthodes de fabrication de l'insuline consiste à faire croître séparément les deux chaînes d'insuline.

Les fabricants ont besoin des deux mini-gènes qui codent pour les deux peptides. Puisque la séquence d'ADN exacte de chaque chaîne est connue, ils synthétisent l'ADN de chaque mini-gène dans une machine de séquençage d'acides aminés. [19] [20]

Ces deux molécules d'ADN sont ensuite insérées dans des plasmides à côté du gène lacZ qui code pour la β -galactosidase, un gène largement utilisé dans les procédures d'ADN recombinant, car il est facile à trouver et à couper, ce qui permet de retirer facilement l'insuline pour qu'elle ne se perde pas dans l'ADN de la bactérie. À côté de ce gène est l'acide aminé méthionine, qui commence la formation de la protéine. [19] [20]

Les plasmides recombinants nouvellement formés sont mélangés avec les cellules bactériennes. Les plasmides pénètrent dans les bactéries dans un processus appelé transfection. Les fabricants peuvent ajouter aux cellules l'ADN ligase, une enzyme qui agit comme une colle pour aider le plasmide à adhérer à l'ADN de la bactérie.

Les bactéries synthétisant l'insuline subissent alors un processus de fermentation. (Voir 3.4.2)

Les cellules sont ensuite retirées des cuves et brisées pour extraire les deux peptides. Pour cela on y ajoute d'abord un mélange de lysosome qui digère la couche externe de la paroi cellulaire, puis un mélange de détergent qui sépare la membrane de la paroi cellulaire grasse.

Le bromure de cyanogène qui divise les chaînes protéiques au niveau des résidus méthionine est ajoutés pour séparer les chaînes d'insuline du reste de l'ADN.

Les deux chaînes sont ensuite mélangées et réunies en ajoutant un réactif oxydant. Le lot est ensuite placé dans une centrifugeuse.

Le mélange est ensuite purifié de sorte que seules les chaînes d'insuline restent. Les fabricants peuvent purifier le mélange par plusieurs techniques de chromatographie ou de séparation, qui exploitent les différences de charge, de taille et d'affinité. Les procédures utilisées comprennent une colonne échangeuse d'ions, une HPLC phase inverse et une colonne de Chromatographie par filtration sur gel. [19] [20]

Les fabricants peuvent tester les lots d'insuline pour s'assurer qu'aucune des protéines de E. coli de la bactérie n'est mélangée avec l'insuline. Ils utilisent une protéine marqueur qui leur permet de détecter l'ADN de E. coli. Ils peuvent alors déterminer que le processus de purification élimine la bactérie E. coli. [19] [20]

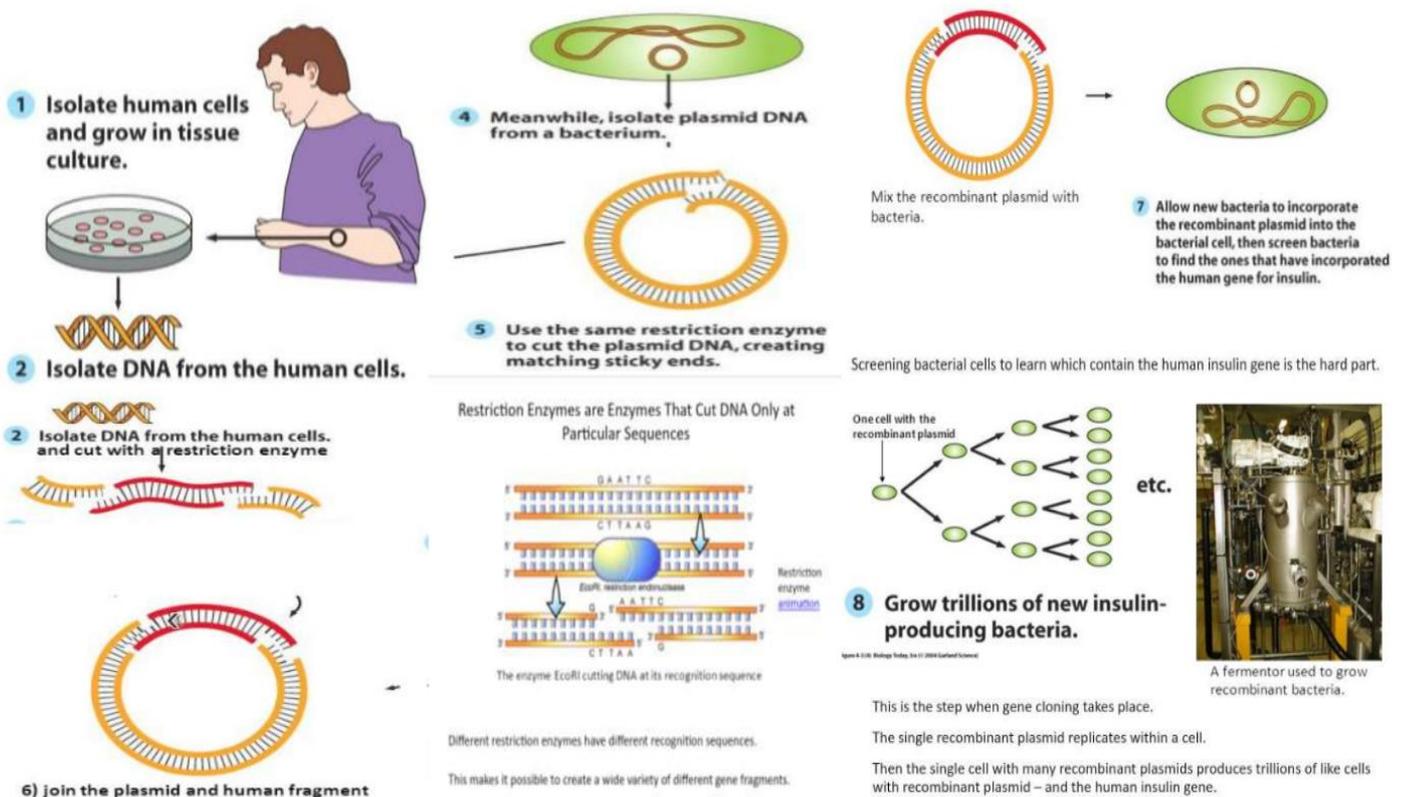


Figure 7 : schémas récapitulatif des différentes étapes de la production de l'insuline par génie-génétique.

Synthetic Insulin – R&D and Industrial level Manufacturing process & requirement

2.2.2 Production à partir de la pro-insuline :

La plupart des étapes sont les mêmes que lors de la production d'insuline avec les chaînes A et B, sauf que dans cette méthode, le gène utilisé est celui de la pro-insuline.

La séquence qui code pour la pro-insuline est insérée dans la bactérie E. coli non pathogène.

Les bactéries passent par le processus de fermentation où elles se reproduisent et produisent de la pro-insuline. Ensuite, la séquence de connexion entre les chaînes A et B est épissée avec une enzyme et l'insuline résultante est purifiée. [19] [20]

2.2.3 Production des analogues de l'insuline

Au milieu des années 1990, les chercheurs ont commencé à améliorer la façon dont l'insuline humaine agit dans le corps en changeant sa séquence d'acides aminés et en créant des analogues, des substances chimiques qui imitent assez bien une autre substance pour tromper la cellule. [21]

Il existe plusieurs analogues de l'insuline (voir tableau 4).

Au lieu de synthétiser la séquence d'ADN exacte pour l'insuline, les fabricants synthétisent un gène de l'insuline où la séquence est légèrement modifiée ce qui permettra d'obtenir directement l'analogue souhaité. [21]

À la fin du processus de fabrication, des additifs sont ajoutés à l'insuline pour produire le type d'insuline de durée souhaitée. Les additifs varient selon les marques du même type d'insuline. [21]

Le tableau suivant résume les différentes modifications pour l'obtention des analogues souhaités

Tableau 5 : les différentes modifications apportées aux analogues de l'insuline		
Analogues	DCI	Modifications
Action rapide	Insuline Lispro	l'inversion de position de la lysine B29 et de la proline
	Insuline Aspart	La proline B28 a été remplacée par l'acide aspartique. Ce changement réduit spontanément l'auto-association en hexamères de l'insuline en solution neutre

	Insuline Glulisine	l'acide aspartique en position B3 de l'insuline humaine est remplacée par la lysine, et la lysine en position B29 est remplacée par l'acide glutamique
Action prolongée	Insuline glargine	L'addition de 2 charges + (2 arg) sur le C-terminal de la chaîne B. Cette modification augmente le pHi à 6,7 ce qui rend la molécule plus soluble dans un milieu légèrement acide et moins soluble au pH physiologique Le remplacement de l'asparagine A21 par la glycine pour éviter la désamidification et la dimérisation de l'insuline glargine car sa solution injectable est acide (pH4).
	Insuline Détémir	Rapidement absorbé dans le sang, se fixe à l'albumine d'où elle n'est ensuite que lentement libérée Suppression de la thréonine en position 30 de la chaîne B, acétylation de la lysine en position 29. L'acide gras ajouté permet la fixation de l'insuline à l'albumine
action intermédiaire	Insuline protamine isophane	une suspension obtenue en mélangeant l'insuline humaine et la protamine en présence de petites quantités de zinc et de phénol (ou de méta crésol)
Action lente et ultra-lente	Insulines retard au zinc	C'est une suspension d'insuline zinc mixte : 70% sous forme cristallisée et 30% sous forme amorphe

3. Contrôle de l'insuline

Le contrôle de la qualité des produits biologiques est un exercice difficile. En effet, la substance active biologique n'est pas une simple entité chimique bien définie mais plutôt un ensemble hétérogène de molécules complexes [22]. Cette complexité moléculaire est appelée micro-hétérogénéité intrinsèque.

L'identité, la pureté, l'activité et la stabilité du produit final sont établies par la réalisation d'un nombre important de tests chimiques, physiques, immunochimiques et biologiques. [23]

Ainsi, le contrôle qualité permet de vérifier que les médicaments fabriqués correspondent à ce qui est attendu et qu'ils sont conformes aux spécifications définies.

Donc, comme pour tous les médicaments, le contrôle qualité s'articule sur 4 étapes importantes :

-Contrôle des matières premières (matériel génétique et banques cellulaires).

- Contrôle du procédé de fabrication.
- Contrôle de la substance active (identité, pureté, activité, sécurité).
- Contrôle du produit fini.

Le tableau 5 suivant représente les principaux tests appliqués dans chaque étape.

Tableau 6 : Tests de contrôle qualité dans la technologie ADN-r

Etapes de fabrication	Nombre de tests	Exemple de tests appliqués
Matériel génétique	5-10	Analyse du caryotype, dépistage des oncogène, stabilité des gènes.
Produits protéique en vrac	20	Séquençage des acide aminés, carte peptidique, HPLC, Radioimmunoassay, western blot
Processus de fabrication	10	Rendement protéique, déficit protéique, suppression des endotoxines
Produit final	30	Analyse protéique, tests de stabilité, contamination par l'ADN, test de congeler-décongeler

Encyclopedia of Pharmaceutical Technology DOI: 10.1081/E-EPT-120041180 Copyright # 2007 by Informa Healthcare USA, Inc. All rights reserved.

3.1. Contrôle des matières premières :

3.1.1. Matériel génétique :

L'identité du gène d'intérêt codé dans le vecteur d'expression, la structure du vecteur d'expression, la combinaison hôte-vecteur ainsi que la stabilité génétique doivent être analysées [24].

3.1.2. Banque cellulaire :

Le guideline ICH Q5D (Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological

Products) définit trois principes clés pour le contrôle de la qualité des banques cellulaires que sont l'identité, la pureté et la stabilité.

Le génotype et le phénotype de la cellule doivent être contrôlés afin de s'assurer de l'identité de la cellule utilisée pour la production.

Les banques cellulaires doivent être exemptes d'agents étrangers potentiellement oncogènes ou infectieux de types viraux, bactériens, fongiques ou mycoplasmiques afin d'assurer la sécurité vis-à-vis du patient.

L'étude de la stabilité des banques cellulaires consiste à évaluer la viabilité des cellules et déterminer une limite d'âge in vitro pour la production. Les tests effectués dépendent de la cellule hôte, du procédé de fabrication et du produit. [25] [26].

3.2. Contrôle du procédé de fabrication :

3.2.1. Contrôles en ligne (monitoring) :

Il consiste à surveiller in situ les paramètres liés au pilotage de la culture cellulaire tels que le pH, la température, la concentration en oxygène et en CO₂ dissous ou l'agitation. [27]

3.2.2. Contrôle hors ligne (échantillonnage) :

Il consiste à réaliser des échantillonnages pour réaliser divers contrôles comme la concentration en produit, substrats et métabolites ou la densité cellulaire. [27]

3.3. Contrôle de la substance active

Essentiel pour garantir l'efficacité, la qualité et la sécurité du médicament:

3.3.1. Test d'identité :

, les propriétés physicochimiques et l'activité biologique doivent être étudiés de manière approfondie.

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.

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).

La puissance peut être évaluée soit par ;

- Des essais biologiques in vivo chez l'animal qui consistent à mesurer la réponse de l'organisme suite à l'administration du produit (pour l'insuline, il se fait par dosage de la glycémie),

- Par des essais biologiques in vitro qui consistent à mesurer la réponse au niveau cellulaire,

- Par des essais biochimiques tels que des réactions ligands-récepteurs. [28] [29]

3.3.2. Tests de pureté :

Le profil de pureté et d'impuretés d'un médicament biologique est complexe. En effet, il existe de nombreuses variantes qui sont dépourvues d'activité biologique et donc considérées comme des impuretés, associés à des impuretés de dégradation et à des impuretés liées au procédé de fabrication. 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. [28] [29]

3.3.3. Tests d'activité :

Consiste en la détermination quantitative et qualitative de la protéine d'intérêt.

Les essais immunochimiques (RAI, ELISA) permettent de doser les protéines qui possèdent la conformation correcte pour l'activité.

Des essais enzymatiques et des essais de liaison au récepteur peuvent être aussi utilisés.

Cependant, ces derniers doivent être associés au test d'activité biologique car certains fragments biologiquement inactifs et des agrégats peuvent aussi être détectés par ces essais. [28] [29]

3.3.4. Tests de sécurité :

Consiste en la recherche des substances pyrogènes dans les produits pharmaceutiques à usage parentéral par la technique in vivo pour limiter à un niveau acceptable le risque de réaction de fièvre chez les patients. [28] [29]

3.4. Contrôle du produit fini :

3.4.1. Dosage de l'insuline :

Se fait par HPLC (voir partie pratique : dosage analytique de l'insuline par HPLC). [28]

3.4.2. Dosage des impuretés de masse moléculaire supérieure à celle de l'insuline :

Se fait par chromatographie d'exclusion, c'est un essai de pureté important dans la mesure où les molécules agrégées possèdent généralement un caractère immunogène. [28]

3.4.3. Dosage des protéines apparentées :

Se fait par HPLC, la surface du pic dû à la A21désamido insuline ne doit pas dépasser 2% de la surface totale des autres pics. [28]

3.4.4. Détermination de l'immunoréactivité de type pro insuline :

Réaliser par une méthode immunochimique de sensibilité appropriée comme la radio-immunologie.

Pour l'insuline humaine produite par la méthode de l'ADN-r, on utilise le réactif international de référence de pro insuline humaine.

L'immunoréactivité de type pro insuline n'est pas supérieur à 10 ppm. [28]

3.4.5. Détermination de la teneur en zinc :

- La détermination de la teneur en zinc se fait par spectroscopie d'absorption atomique.
- Calculée par rapport à la substance desséchée.
- La teneur en zinc ne doit pas être supérieure au pourcentage constaté dans les monographies correspondantes. [28]

3.4.6. Perte à la dessiccation :

Déterminer par chauffage à l'étuve à 100-105°C pendant 24h sur 0.2g d'insuline humaine, la perte à la dessiccation n'est pas supérieure à 10%. [28]

3.4.7. Cendres sulfuriques :

Déterminer sur 0.2g d'insuline humaine et calculé par rapport à la substance desséchée, le taux de cendres sulfurique n'est pas supérieur à 2.5%. [28]

3.4.8. Recherche d'endotoxines bactériennes :

Les méthodes suivantes peuvent être utilisées pour surveiller la concentration d'endotoxines :

- Méthode de formation de gel
- Méthode formation gel semi-quantitative
- Méthode cinétique turbidimétrique
- Méthode chromogénique cinétique
- Méthode chromogénique de point final

Ils doivent être moins de 10UI/mg, si l'insuline est destinée à la préparation de formes pharmaceutiques administrées par voie parentérale. (Voir partie pratique : recherche d'endotoxines bactériennes). [28]

CHAPITRE III: FORMAT CTD (DOCUMENT TECHNIQUE COMMUN).

1.Introduction :

Une documentation et des données substantielles sont requises dans les demandes d'autorisation d'importation / de fabrication et de commercialisation de médicaments à usage humain, ce qui entraîne des applications complexes et de grande envergure.

À ce jour, les candidats ont utilisé de nombreuses approches différentes pour organiser l'information et ces différences ont rendu le contrôle plus difficile et peuvent également mener à l'omission de données ou d'analyses critiques, pouvant entraîner des retards inutiles dans les approbations.

Ainsi, le CTD a été créé afin de surmonter ces obstacles et est devenu le format obligatoire pour les nouvelles demandes de médicaments dans l'UE et au Japon, et le format de choix fortement recommandé aux États-Unis. [29]

2.Definition CTD :

-Format d'application.

-Le CTD est un ensemble de spécifications pour un dossier d'enregistrement de médicaments.

-Le CTD est un « format commun bien structuré » internationalement convenu pour l'organisation des exigences techniques devant être soumis à l'autorité de régulation en tant que demande d'enregistrement de produits pharmaceutiques à usage humain dans les trois régions de l'ICH (USA, Europe et Japon).

-Le CTD est organisé en cinq modules. Le module 1 est spécifique à une région et les modules 2, 3, 4 et 5 sont destinés à être communs à toutes les régions (voir titre4).

-le CTD est maintenu par ICH. [29]

3.Interet du CTD :

- Fournir un format / modèle commun harmonisé pour la soumission des exigences techniques aux autorités de réglementation acceptable dans les trois régions de l'ICH

-Réduire le temps et les ressources utilisés pour compiler les demandes :

- ✓ Cela facilitera la préparation des soumissions électroniques. □
- ✓ Faciliter la soumission simultanée dans trois régions. □
- ✓ Faciliter l'échange d'informations réglementaires. □
- ✓ Disponibilité plus rapide de nouveaux médicaments. [29]

4.contenu du CTD :

4.1 Module 1 : Information administrative régionale

Le Module1 est destiné aux informations administratives et aux informations de prescription et devrait contenir des documents spécifiques à chaque région. Par exemple, les formulaires de demande ou l'étiquette proposée pour une utilisation dans la région. [29]

Module 1 : informations générales	
1.1	Lettre de motivation et table des matières
1.2	Informations administratives
1.2.1	Brève introduction sur la société requérante
1.2.2	Documents juridiques et critiques
1.2.3	Coordonnées liées à l'applicant (noms, adresse, téléphone, fax, e-mail)
1.3	Informations générales sur le produit médicamenteux
1.3.1	Résumé des caractéristiques du produit, étiquetage et notice
1.3.2	Maquettes
1.3.3	Echantillons
1.3.4	Consultation avec un groupe de patients cibles
1.3.5	Information sur le produit approuvé par l'autorité compétente

1.3.6	Braille
1.3	Information concernant les experts de chaque partie
1.3.1	Qualité : nom, adresse, signature
1.3.2	Non clinique : nom, adresse, signature
1.3.3	Clinique
1.4	Les exigences spécifiques pour les différents types de demandes
1.4.1	Données supplémentaires exigées dans des situations spécifiques
1.4.2	Médicaments essentiellement similaires
1.4.3	Associations médicamenteuses spécifiques
1.4.4	Documentation pour les demandes d'autorisation dans des circonstances exceptionnelles
1.4.5	Demandes mixtes d'autorisation de mise sur le marché
1.5	Evaluation du risque pour l'environnement

4.2 module 2 : résumés

Il est destiné à résumer l'information sur la qualité (chimique, pharmaceutique et biologique) ainsi que les données non cliniques et clinique qui figurent dans les modules 3, 4, 5 du CTD. [29]

Module 2 : résumés	
2.1	Table des matières
2.2	Introduction
2.3	Quality overall summary(QOS)
2.3.S	Sommaire de la substance médicamenteuse (information générale, fabrication, caractérisation, contrôle, stabilité)
2.3.P	Sommaire de la production médicamenteuse (composition, fabrication, contrôle excipients, contrôle médicamenteux,

	standard de référence, stabilité)
2.3.A	Annexes
2.4	Aperçue de la partie non clinique
2.5	Aperçue su la partie clinique
2.6	Résumé non clinique
2.7	Résumé clinique

4.3 module 3 :

La section Qualité du document technique commun (M4Q) fournit une structure et un format harmonisés pour la présentation des informations chimique, de fabrication et de contrôles dans un dossier d'enregistrement. [29]

Module 3 : qualité	
3.1	Table des matière
3.2	Corps des données
3.2.S	Substance active
3.2.S.1	Informations générales
3.2.S.1.1	Nomenclature
3.2.S.1.2	Structure chimique pour les produits biologique :déterminer la séquence peptidique, sites de glycosylation et autres modifications.
3.2.S.1.3	Propriétés générales
3.2.S.2	Fabrication de la substance active
3.2.S.2.1	Fabricant (s) (noms, adresse)
3.2.S.2.2	Procèdes de fabrication et de contrôles en cours de fabrication produits biologique :souches, l'inoculum, banque de travail, étapes intermédiaires, procèdes de purification, Ph, t° doivent être résumés.
3.2.S.2.3	Contrôle des matières

3.2.S.2.4	Contrôle des étapes critiques et des produits intermédiaires
3.2.S.2.5	Validation et/ou évaluation du procédé
3.2.S.2.6	Développement du procédé de fabrication
3.2.S.3	Caractérisation
3.2.S.3.1	Elucidation de la structure et d'autres caractéristiques Produits biologique : structure primaire, secondaire ou d'ordre supérieure ainsi que les modifications post traductionnelle doivent être résumés
3.2.S.3.2	Impuretés
3.2.S.4	Contrôle de la substance active
3.2.S.4.1	Spécification*
3.2.S.4.2	Procédures analytiques*
3.2.S.4.3	Validation des procédé analytiques*
3.2.S.4.4	Analyse des lots
3.2.S.4.5	Justification de la spécification*
3.2.S.5	Normes de référence ou matériaux
3.2.S.6	Système de fermeture de récipient
3.2.S.7	Stabilité de la substance active
3.2.P	Produit fini
3.2.P.1	Description et composition du produit fini
3.2.P.2	Développement pharmaceutique
3.2.P.2.1	Constituants du produit fini (substance active, excipients)
3.2.P.2.2	Produit fini (DCI, forme, dosage) - développement de la formulation - surdosage - propriétés physico-chimique et biologique

3.2.P.2.3	Développement du procédé de fabrication
3.2.P.2.4	Système de fermeture de récipient
3.2.P.2.5	Attributs microbiologiques
3.2.P.2.6	Compatibilité du principe actif avec les excipients
3.2.P.3	Fabrication
3.2.P.3.1	Fabricant(s)
3.2.P.3.2	Composition
3.2.P.3.3	Description du procédé de fabrication et des contrôles des opérations
3.2.P.3.4	Contrôles des étapes critiques et intermédiaires
3.2.P.3.5	Validation et/ou évaluation de procédé
3.2.P.4	Contrôle des excipients
3.2.P.4.5	Excipients d'origine humaine ou animale
3.2.P.4.6	Excipients nouveaux
3.2.P.5	Contrôle du produit fini
3.2.P.5.4	Analyse des lots
3.2.P.5.5	Caractérisation des impuretés
3.2.P.6	Normes ou substances de référence
3.2.P.7	Système de fermeture de conditionnement primaire et secondaire
3.2.P.8	Stabilité
3.2.P.8.1	Résumé et conclusion en matière de stabilité
3.2.P.8.2	Protocole de la stabilité post autorisation et engagement en matière de stabilité
3.2.P.8.3	Données sur la stabilité
3.2.A	Annexes

3.2.A.1	Installations et équipements
3.2.A.2	Évaluation de la sécurité des agents adventifs
3.2.A.3	Excipients
3.3	Littérature de référence

4.4. Module 4 : Informations non-clinique

Décrit le format et l'organisation des données non cliniques (pharmaco-toxicologiques) pertinentes pour l'application. [29]

Module 4 : informations non-clinique	
4.1	Table des matières du module 4
4.2	Rapports d'études
4.2.1	pharmacodynamie (primaire, secondaire, de sécurité, interactions pharmacodynamiques)
4.2.2	Pharmacocinétique (absorption, distribution, métabolisme, excrétion)
4.2.3	Toxicologie
4.2.3.1	Toxicité aiguë
4.2.3.2	Toxicité à doses répétées
4.2.3.3	Génotoxicité
4.2.3.4	Cancérogénicité
4.2.3.5	Toxicité pour la reproduction et le développement
4.2.3.6	Tolérance locale
4.2.3.7	Autres études de toxicité (si disponible)
4.3	Littérature de référence

4.5 Module 5 : informations cliniques

Décrit le format et l'organisation des données cliniques pertinentes pour l'application. [29]

Module 5 : informations cliniques	
5.1	Table des matières du module5
5.2	liste tabulaire de toutes les études cliniques
5.3	Rapport de l'étude clinique
5.3.1	Rapports d'études biopharmaceutiques
5.3.1.1	Rapport de l'étude de biodisponibilité
5.3.1.2	Rapports d'études comparatives de biodisponibilité et de bioéquivalence
5.3.1.3	Rapports d'études de corrélation in vitro –in vivo
5.3.1.4	Etude bio analytique et validation de la méthode
5.3.2	Rapports d'études pertinentes à la pharmacocinétique
5.3.2.1	Rapports d'études de la liaison aux protéines plasmatiques
5.3.2.2	Rapports d'études de métabolisme hépatique et des interactions
5.3.2.3	Rapports d'études des autres voies du métabolisme
5.3.3	Estimation des paramètres pharmacocinétique (C max, T max)
5.3.4	Rapport des études pharmacodynamique
5.3.4.1	Rapports d'études de la PC et PD chez des sujets sains
5.3.4.2	Rapports d'études de la PC et PD chez des sujets malades
5.3.5	Rapports d'études de l'efficacité et de la sécurité
5.3.5.1	Rapports d'études cliniques contrôlées pertinentes à l'indication revendiquée
5.3.5.2	Rapports d'études cliniques non contrôlées

5.3.5.3	Rapports d'analyses de données provenant de plus d'une étude
5.3.5.4	Autres rapports d'étude
5.3.6	Rapports d'expérience post-marketing
5.3.7	Formulaires de rapport de cas et listes individuelles de patients
5.4	Bibliographie

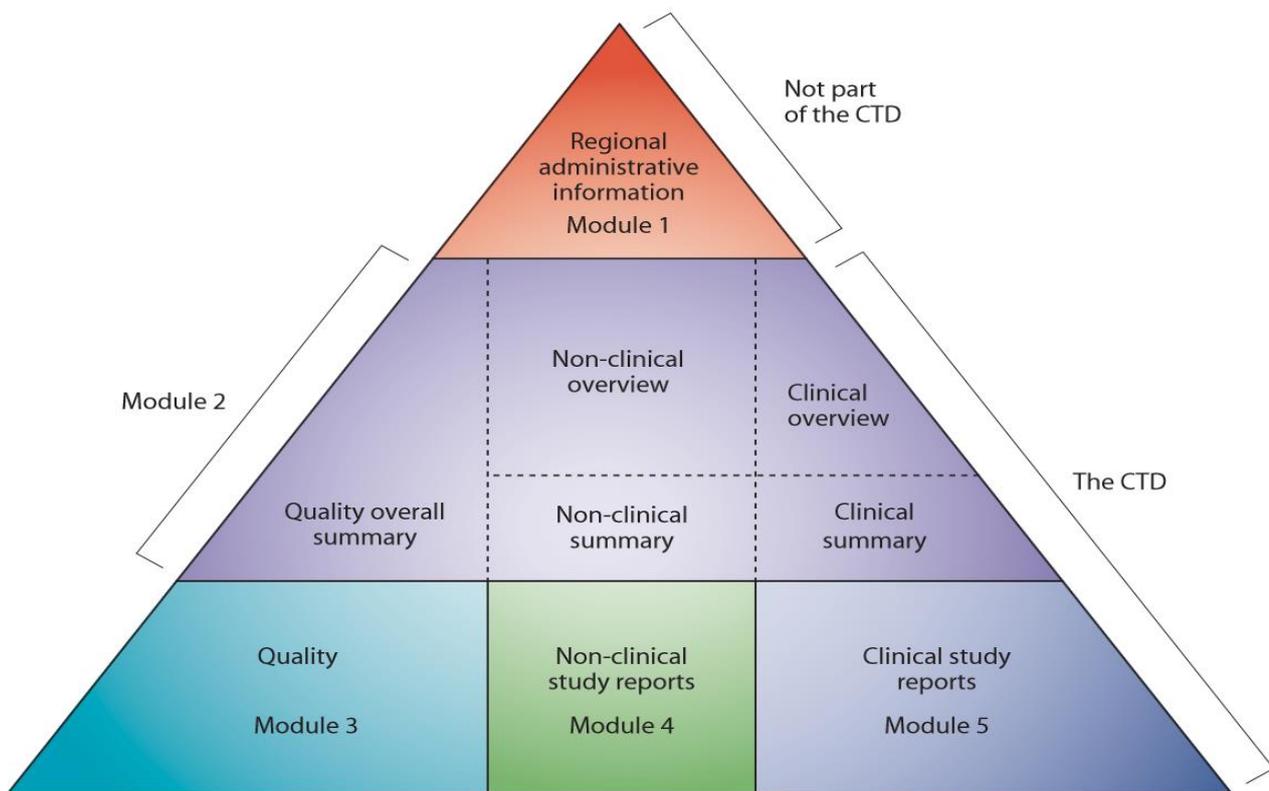
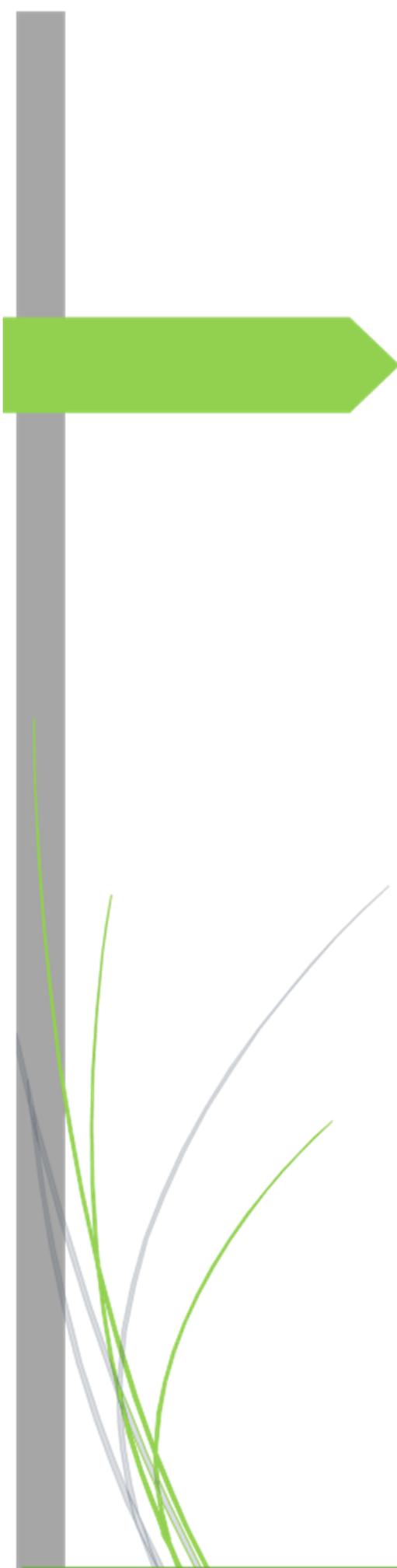


Figure 8 : organisation du format CTD

ICH: International Conference of Harmonization

- ❖ Les tests réalisés dans notre étude à savoir : la toxicité anormale, l'effet biologique de l'insuline et le test d'endotoxines bactériennes concerne le module 4 du format CTD.



PARTIE PRATIQUE



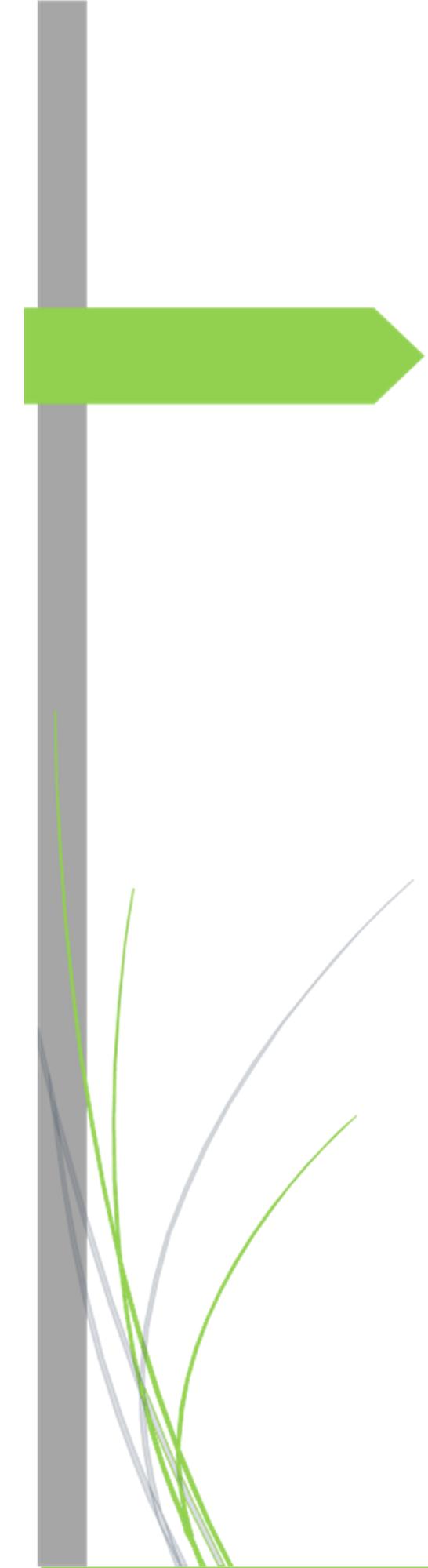
Le laboratoire de contrôle des produits pharmaceutique (LNCPP) est un établissement public à caractère administratif, doté de la personnalité morale et de l'autonomie financière, placé sous la tutelle du ministère chargé de la santé.

Il a pour mission principale le contrôle de la qualité et expertise des produits pharmaceutiques qui comprennent les médicaments, les réactifs biologiques, les produits galéniques, et tout autre produits nécessaires 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 est 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 recherche technique et scientifique liée à son objet.
- La réalisation de toute étude en rapport avec sa mission.
- 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.



MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS ET METHODES

Objectifs

- Connaitre les principales différences au niveau règlementaire entre les produits biologiques et les produits chimiques.
- Evaluation de l'activité hypoglycémique de deux types d'insuline, une a action mixte et l'autre a action lente.
- Contrôle de l'innocuité des insulines testées vis-à-vis des contaminations biologiques et des endotoxines bactériennes

1. Différence réglementaire entre médicaments biologiques et médicaments chimiques

Pour garantir la qualité et la sécurité des produits biologiques à visée thérapeutique, les différents organismes et autorités publient des réglementations et guides spécifiques.

Pour un produit commercialisé à l'échelle internationale, l'industriel devra assurer sa conformité par rapport au dossier d'enregistrement ainsi qu'aux référentiels applicables dans les différentes zones géographiques.

Tout médicament doit être soumis aux autorités concernées puis approuvé par ces derniers avant d'être commercialisé.

Le CTD est un dossier commun à toutes les demandes d'AMM pour tous les pays, il représente un modèle commun harmonisé pour la soumission des exigences techniques aux autorités de réglementation.

Les produits biologiques représentent une nouvelle classe de médicaments. Par conséquent, ils présentent des différences au niveau réglementaire, contrôle qualité etc., voici les différences retrouvées :

1.1. Le brevet :

Le développement d'un nouveau médicament par une société pharmaceutique que ce soit d'origine chimique ou biologique est sous la protection du brevet. Cela signifie que seule la firme pharmaceutique qui détient le brevet, peut fabriquer, lancer le médicament et réaliser sur le marché un éventuel bénéfice. Une fois que le brevet a expiré, le médicament peut être manufacturé et vendu par d'autres compagnies.

Les médicaments chimiques sont caractérisés par un brevet qui protège uniquement le produit. Par contre pour ce qui est des produits biologiques, le brevet couvre le produit et même le procédé de fabrication. Par conséquent, une fois le brevet tombe dans le domaine public, le procédé de fabrication des produits biologiques ne sera pas révélé et restera confidentiel. [30]

1.2. Complexité de structure :

Les produits issus de la biotechnologie sont caractérisés par une complexité structurale de par leur nature protéique, pouvant aller d'oligopeptides jusqu'à une structure tertiaire ou même quaternaire contrairement au produits chimiques de structure simple et connue, ce qui rend difficile leur caractérisation, nécessitant ainsi une combinaison de tests entrants dans le cadre de contrôle qualité. [30]

1.3. Activité biologique

Les biomédicaments sont caractérisés par la notion d'activité biologique c'est à dire de tester ou de déterminer leurs effets sur un organisme (méthode in vivo) ou sur un tissu vivant (méthode in vitro) après interaction.

Cet essai représente une étape obligatoire dans le contrôle qualité pour tous produits biologiques et doit être détaillé dans le module 4 du CTD.

Contrairement aux produits biologiques, les médicaments chimiques subissent uniquement des dosages analytiques selon des méthodes standardisées dans les différentes pharmacopées. [31]

1.4. Notion de génériques et de biosimilaires

La spécialité générique est définie comme celle qui a la même composition qualitative et quantitative en principes actifs, la même forme pharmaceutique et dont la bioéquivalence avec la spécialité de référence est démontrée par des études de biodisponibilité appropriées.

Un médicament biologique similaire est tout médicament biologique de même composition qualitative et quantitative en substance active et de même forme pharmaceutique qu'un médicament biologique de référence mais qui ne remplit pas les conditions prévues pour être considéré comme une spécialité générique en raison de différences liées notamment à la variabilité de la matière première ou aux procédés de fabrication, nécessitant l'élaboration de données précliniques et cliniques supplémentaires dans des conditions déterminées.

Les médicaments génériques, contrairement à un nouveau médicament, font l'objet d'une demande d'autorisation de mise sur le marché allégée. Les données non cliniques et cliniques requises initialement pour le nouveau produit sont réduites à des études de biodisponibilité appropriées visant à démontrer la bioéquivalence avec le médicament de référence. Cependant, de par la nature, la variabilité ainsi que la complexité de la fabrication et du contrôle de la qualité des médicaments issus des biotechnologies, cette procédure d'enregistrement allégée particulière aux génériques ne peut être appliquée aux médicaments biosimilaires. En effet, cette procédure est adaptée à des molécules chimiques bien définies dont la science est maîtrisée et facilement reproductible, mais dans le cas des biomédicaments, elle induirait le risque de voir apparaître sur le marché des produits trop variables par rapport à la référence et donc un risque pour la santé du patient.

La mise en place d'une réglementation spécifique aux biosimilaires, distincte de celle des médicaments génériques et plus poussée, a donc été nécessaire pour encadrer l'enregistrement et garantir la mise sur le marché de produits sûrs et efficaces. [32]

1.5. Concept de biosimilarité et exercice de comparabilité :

L'octroi d'une autorisation de mise sur le marché d'un médicament biosimilaire repose sur une notion de comparabilité extensive afin de prouver la biosimilarité à un médicament biologique de référence par le biais d'un exercice de comparabilité.

Le concept de biosimilarité s'applique à un produit thérapeutique qui revendique des caractéristiques similaires à celles d'un produit déjà commercialisé dont le brevet de protection est arrivé à échéance. Il repose sur le principe de comparaison entre un produit souhaitant obtenir le statut de biosimilaire et un médicament biologique novateur, pris comme référence.



Figure 9 : schéma représentatif des principales différences entre un produit biosimilaire et un produit chimique.

Comme montrés sur la figure ci-dessus, les autorités réglementaires demandent 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 cliniques et cliniques pourront être réduits et basés sur l'exercice de comparabilité seulement[32].

1.6. Notion d'immunogénicité et de toxicité

Les produits biologiques thérapeutiques sont caractérisés par la notion d'immunogénicité c'est-à-dire, leur tendance à générer une réponse immunitaire spécifique à eux même, ou à des protéines apparentées, ou bien à induire des effets non cliniques ou des effets cliniques indésirables d'origine immunologique. Cependant, bien que de nombreux produits biologiques soient immunogènes dans une certaine mesure, il est assez rare que l'immunogénicité entraîne de graves événements indésirables. Des études sont faites par tous les industriels pour évaluer significativement l'immunogénicité, les résultats doivent être mentionnés dans le module 5 du CTD.

Contrairement aux médicaments biologiques qui sont peu ou pas toxiques, les médicaments chimiques sont caractérisés par une toxicité qui peut aller de l'absence d'effets aux syndromes graves et potentiellement mortels. [31]

1.7. Etudes de stabilité

Les études de stabilité faites sur les médicaments chimiques ne peuvent être appliquées aux médicaments biologiques car ils sont d'origine protéique donc thermolabiles. De ce fait, elles sont réalisées à des températures de 20°C, -20°C, -40°C, -70°C et le protocole suivie doit être détaillé dans le module 3 du CTD. [32]

2. Caractéristiques des produits a testés

2.1. Novomix 30 : [32]

2.1.1 Présentation quantitative et qualitative :

1 ml de suspension contient 100 unités **d'insuline asparte soluble/insuline asparte protamine cristallisée** dans un rapport de 30/70 (soit 3,5 mg). 1 stylo pré rempli contient 3 ml soit 300 unités.

L'insuline asparte est produite sur *Saccharomyces cerevisiae* par la technique de l'ADN recombinant.

2.1.2 Forme pharmaceutique :

Suspension injectable.

La suspension est opaque, blanche et aqueuse.

2.1.3 Informations cliniques :

2.1.3.1 Indications thérapeutiques :

NovoMix 30 est indiqué dans le traitement du diabète de l'adulte, de l'adolescent et de l'enfant à partir de 10 ans.

2.1.3.2 Posologie et mode d'administration :

2.1.3.2.1 Posologie :

Chez les patients diabétiques de type 1, les besoins individuels en insuline se situent généralement entre **0,5 et 1,0 unité/kg/jour**. Ces besoins peuvent être couverts en partie ou en totalité par NovoMix 30.

Un ajustement de la dose peut être nécessaire si le patient augmente son activité physique, modifie son régime alimentaire habituel ou en cas de maladie concomitante.

2.1.3.2.2 Mode d'administration :

NovoMix 30 doit être administré par voie sous-cutanée dans la cuisse ou la paroi abdominale. Si besoin, la région fessière ou deltoïde peuvent être utilisées. Une rotation des sites

d'injection au sein d'une même région devra toujours être effectuée afin de diminuer le risque de développer une lipodystrophie.

2.1.3.3 Contre-indications :

NovoMix® 30 est contre-indiqué :

- durant les épisodes d'hypoglycémie ;
- chez les patients présentant une hypersensibilité connue à ce médicament, à l'un des ingrédients de la préparation ou à l'un des composants du récipient.

2.1.3.4 Les effets indésirables :

- Hypoglycémie
- Réactions anaphylactiques
- Lipodystrophie

2.1.4 Propriétés pharmacologiques

2.1.4.1 Propriétés pharmacodynamiques :

2.1.4.1.1 Classe pharmaco-thérapeutique :

Médicaments utilisés dans le diabète. Insulines et analogues pour injection, combinaison d'un analogue à action intermédiaire ou lente et d'un analogue à action rapide.

NovoMix 30 est une suspension biphasique de 30 % d'insuline asparte soluble (analogue de l'insuline humaine à action rapide) et de 70 % d'insuline asparte protamine cristallisée (analogue de l'insuline humaine à action intermédiaire).

2.1.4.1.2 Mécanisme d'action et effets pharmacodynamiques :

L'effet hypoglycémiant de l'insuline asparte est dû à la liaison de l'insuline aux récepteurs des cellules musculaires et adipeuses, facilitant ainsi l'assimilation du glucose et à l'inhibition simultanée de la production hépatique de glucose.

- NovoMix 30 est une insuline biphasique qui contient 30 % d'insuline asparte soluble. Grâce à son délai d'action rapide, on peut l'administrer plus près des repas (de 0 à 10 minutes avant/après le repas), elle permet ainsi de diminuer l'hyperglycémie post prandial. Son pic d'action apparaît entre 1 heure à 4 heures après injection.

La phase cristalline (70 %) est constituée d'insuline asparte protamine cristallisée, dont le profil d'activité est similaire à l'insuline humaine basale.

La figure suivante représente le profils d'activité du NOVOMIX.

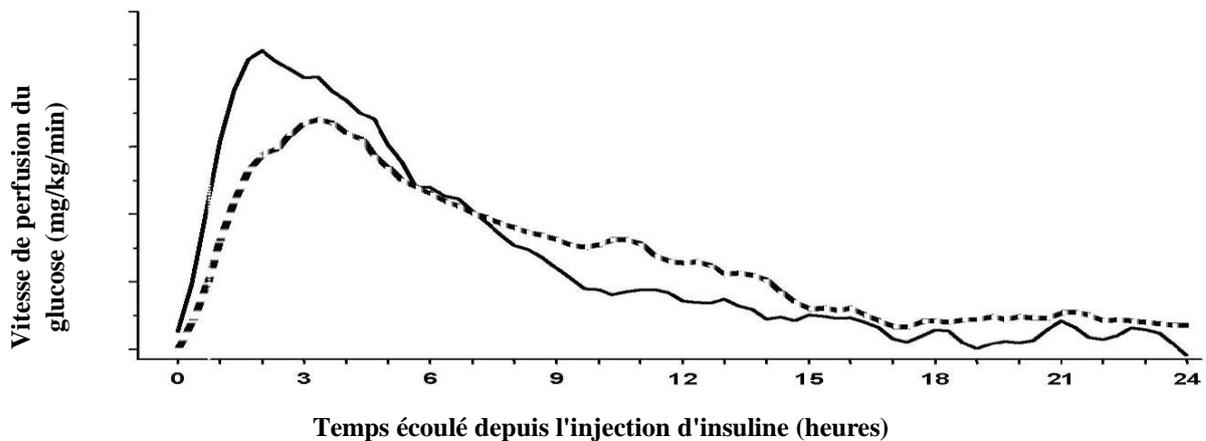


Figure 10 : Profil d'activité de NovoMix 30 (—) et de l'insuline humaine biphasique 30 (---) chez des sujets sains

2.1.4.2 Propriétés pharmacocinétiques

La substitution de l'acide aminé proline par l'acide aspartique en position B28 de l'insuline asparte réduit la tendance à la formation d'hexamères comme ce qui est observé avec l'insuline humaine soluble ; elle est absorbée plus rapidement à partir du tissu sous-cutané que la fraction soluble de l'insuline humaine biphasique.

L'insuline asparte protamine cristallisée sous forme de cristaux a un profil d'absorption prolongée et est similaire à celui de l'insuline humaine NPH.

La demi-vie moyenne ($t_{1/2}$) de NovoMix 30, qui reflète la vitesse d'absorption de la fraction liée à la protamine est de 8 à 9 heures environ. Le retour aux concentrations sériques de départ se fait en 15 à 18 heures après injection sous-cutanée de la dose.

2.2. Levemir FlexPen : [32]

2.2.1. Présentation quantitative et qualitative :

1 ml de solution contient 100 unités d'insuline détémir (équivalent à 14,2 mg). 1 stylo prérempli contient 3 ml équivalent à 300 unités.

L'insuline détémir est produite dans *Saccharomyces cerevisiae* par la technique de l'ADN recombinant.

2.2.2. Forme pharmaceutique :

Solution injectable.

La solution est limpide, incolore et aqueuse.

2.2.3. Informations cliniques :

2.2.3.1. Indications thérapeutiques :

Levemir est indiqué dans le traitement du diabète de l'adulte, de l'adolescent et de l'enfant à partir de 1 an.

2.2.3.2 Posologie et mode d'administration :

2.2.3.2.1 Posologie :

Levemir peut être utilisé seul comme une insuline basale ou en association à un bolus d'insuline. Levemir peut également être utilisé en association à des antidiabétiques oraux et/ou des agonistes des récepteurs du GLP-1.

Lorsque Levemir est utilisé en association avec les antidiabétiques oraux ou en ajout des agonistes des récepteurs du GLP-1, il est recommandé d'utiliser Levemir une fois par jour, initialement à la dose de 0,1–0,2 unités/kg ou de 10 unités chez les patients adultes. La dose de Levemir doit être ajustée en fonction des besoins individuels du patient.

Lorsqu'un agoniste des récepteurs du GLP-1 est ajouté à Levemir, il est recommandé de diminuer la dose de Levemir de 20 % afin de minimiser le risque d'hypoglycémie. Par la suite, la dose doit être ajustée individuellement.

2.2.3.2.2 Mode d'administration :

Levemir doit être administré par voie sous-cutanée par injection dans la paroi abdominale, la cuisse, le haut du bras, la région deltoïde ou la région fessière. Une rotation des sites d'injection au sein d'une même région devra toujours être effectuée afin de diminuer le risque de développer une lipodystrophie.

2.2.3.2.3 Contre-indications :

LEVEMIR® est contre-indiqué :

- durant les épisodes d'hypoglycémie ;
- chez les patients présentant une hypersensibilité connue à ce médicament, à l'un des ingrédients de la préparation ou à l'un des composants du récipient

2.2.3.2.4 Les effets indésirables :

- Hypoglycémie
- Réactions anaphylactiques
- Lipodystrophie

2.2.4. Propriétés pharmacologiques

2.2.4.1. Propriétés pharmacodynamiques :

2.2.4.1.1. Classe pharmaco-thérapeutique :

Classe pharmaco-thérapeutique : médicaments utilisés dans le diabète. Insulines et analogues pour injection, d'action lente.

2.2.4.1.2. Mécanisme d'action et effets pharmacodynamiques :

Levemir est un analogue soluble de l'insuline d'action prolongée utilisé comme une insuline basale.

L'effet hypoglycémiant de Levemir est dû à la liaison de l'insuline aux récepteurs des cellules musculaires et adipeuses, facilitant ainsi l'assimilation du glucose, et à l'inhibition simultanée de la production hépatique de glucose.

L'action prolongée de Levemir résulte d'une forte association des molécules d'insuline détémir entre elles au niveau du site d'injection et de leur liaison à l'albumine par l'intermédiaire de la chaîne latérale de l'acide gras. L'insuline détémir se distribue plus lentement que l'insuline NPH dans les tissus cibles périphériques. La figure suivante représente le profil cinétique du LEVEMIR.

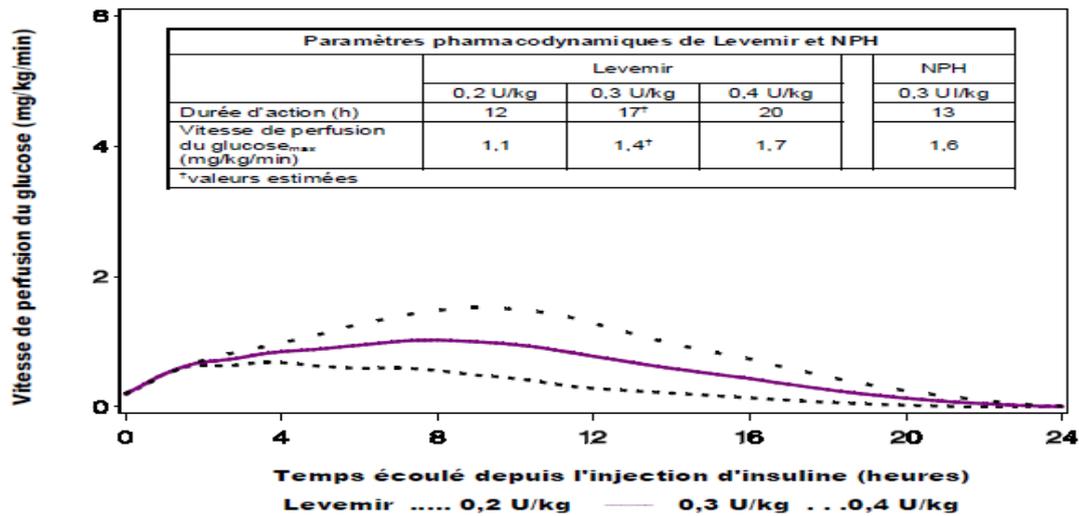


Figure 11 : profil cinétique du LEVEMIR

Pour des doses comprises entre 0,2 et 0,4 unités/kg (U/kg), Levemir exerce plus de 50 % de son effet maximum dès 3-4 heures et jusqu'à 14 heures environ après l'administration de la dose.

La réponse pharmacodynamique observée (effet maximum, durée d'action et effet général) après injection sous-cutanée est proportionnelle à la dose.

2.2.4.2. Propriétés pharmacocinétiques

2.2.4.2.1. Absorption :

La concentration sérique maximum est atteinte entre 6 et 8 heures après l'administration. Lorsque la dose doit être administrée deux fois par jour, les concentrations sériques à l'équilibre sont atteintes au bout de 2 ou 3 administrations. La variabilité d'absorption intra-individuelle est plus faible avec Levemir qu'avec les autres insulines basales.

La biodisponibilité absolue de l'insuline détémir administrée par voie sous-cutanée est d'environ 60 %.

2.2.4.2.2. Distribution

Le volume de distribution apparent de Levemir (environ 0,1 l/kg) indique qu'une part importante de l'insuline détémir circule dans le sang.

Les résultats d'études *in vitro* et *in vivo* de liaison aux protéines suggèrent qu'il n'existe pas d'interaction cliniquement significative entre l'insuline détémir et les acides gras ou avec d'autres médicaments se liant aux protéines.

2.2.4.2.3. Biotransformation

La dégradation de l'insuline détémir est semblable à celle de l'insuline humaine ; tous les métabolites formés sont inactifs.

2.2.4.2.4. Élimination

La demi-vie terminale après une administration sous-cutanée est déterminée par la vitesse d'absorption à partir du tissu sous-cutané. La demi-vie terminale est comprise entre 5 et 7 heures en fonction de la dose.

3. Evaluation toxicologique de l'insuline

Dans notre travail on s'intéressera à l'évaluation toxicologique de deux types d'insuline, **l'insuline détemir** et **l'insuline aspartate/aspartate cristallisé**. Notre évaluation se fera en deux tests : test de la toxicité anormale et LAL test.

3.1. ESSAI DE LA TOXICITE ANORMALE DE L'INSULINE :

Selon la pharmacopée européenne, le test de toxicité anormale englobe deux test, le test général et le test pour vaccin et sérum immun. Dans notre étude, on a réalisé le test général conformément aux directives de la pharmacopée européenne. Car, il s'applique généralement aux produits biologiques notamment aux insulines pour la détection de toute contamination biologique.

3.1.1 Objectif :

Vérifier l'absence d'une toxicité anormale, qui serait due à une toxicité surajoutée par les conditions de fabrication, de conditionnement ou de stockage du médicament ou bien d'une contamination biologique potentiellement dangereuse.

3.1.2 Principe :

Il consiste à observer chez 05 souris saines pesant chacune de 17 à 23 g des signes de morbidité ou une mortalité après administration en une seule prise d'une dose maximale efficace non toxique de deux types d'insuline, **insuline détemir** et **insuline aspartate/aspartate cristallisé** sous forme de solution injectable.

3.1.3 Locaux et conditions ambiantes :

L'essai est effectué dans un lieu tranquille ou aucune perturbation ne risque d'exciter les animaux.

3.1.4 Equipements :

- Boites à contention pour souris.
- pH mètre.
- Balance pour la pesée des animaux.
- Balance de précision.

- Réfrigérateur pour la conservation de l'insuline.
- Agitateur thermique.

3.1.5 Consommables :

- Seringue à insuline de 1ml.
- Compresses.
- Aiguilles de seringues.
- Micropipettes.
- Tubes.
- Récipients.
- Fioles.
- Eprouvettes.
- Bêchers.

3.1.6. Réactifs :

3.1.6.1. Réactifs chimiques :

- L'eau physiologique.
- **Insuline détemir**
- **Insuline aspartate/aspartate cristallisé**

3.1.6.2 Réactifs biologiques :

- Souris pesant entre 17et 22 g.
- Sexe : mâles ou femelles.
- Nombre : 10
- Poids : voir tableau des résultats.



Figure 12: Souris mâle ou femelle pesant entre 17 et 22g.

3.1.7 Mode opératoire :

3.1.7.1 Préparation des animaux :

Sélectionner 10 souris saines, pesant entre 17 et 22 g partagé en deux groupes séparés.

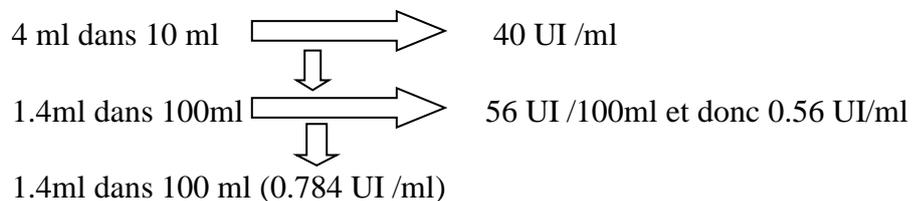


Figure 13 : Souris utilisées pour le test de la toxicité anormale.

3.1.è.2 Préparation des solutions d'insuline :

- La dose administrée est de : 0,39UI /0 ,5 ml
- La dilution :

On a 100 UI /ml ;



- La dose administrée par Kg :

20g \longrightarrow 0.39 UI

1000g \longrightarrow X

X=0.196 UI.

Pour préparer cette solution on prend 0.20 ml du stylo d'insuline (100 UI/ml) qu'on dilue dans 49 ml d'eau physiologique.



Figure 14 : Préparations des solutions à injecter

3.1.7.3 Volumes des solutions à injecter

Le volume à injecter est de 0.5 ml.

3.1.7.4 Administrations des solutions :

- ✓ Deviser les souris en deux groupes égaux de 5 souris par groupe.
- ✓ Injecter par voie sous cutané la dose à administrée.



Figure 15 : Injection sous cutanée des solutions préparées.

✓ **Normes et interprétation**

Le test est acceptable si aucune des souris ne meurt ou ne présentent pas de signes de morbidité dans les 24 heures.

- **Le produit est non conforme** si plus d'une souris meurt.
- Si l'un des animaux meurt répétez le test, **le produit est conforme** si aucun des animaux dans le second groupe meurt.
- Si plusieurs animaux meurent, le produit est **non conforme**.

3.2 Recherche d'endotoxines bactériennes : méthode au gel point final

Ce test a été réalisé conformément à la monographie de la pharmacopée européenne et selon la procédure interne du LNCPP afin de surveiller la concentration d'endotoxines bactériennes dans les produits pharmaceutiques à usage parentérale notamment nos produits à tester.

3.2.1 Objectif :

L'objectif de ce test est de surveiller la concentration d'endotoxines dans les produits pharmaceutiques à usage parentérale et de déterminer si le produit est conforme à la limite spécifiée dans la monographie de la pharmacopée.

3.2.2 C'est quoi une endotoxine bactérienne ?

Les bactéries Gram-négatives ont une membrane externe formée par des lipopolysaccharides. Cette structure est toxique pour d'autres organismes supérieurs, tels que les animaux et les humains. Ces lipopolysaccharides sont connus en tant qu'endotoxines afin de les différencier des autres toxines qui pourraient être sécrétées par les bactéries, mais ne forment pas une partie de leur structure, appelée exotoxines. Lorsque les bactéries se multiplient ou sont détruites, une partie de ces endotoxines sont libérées, accomplissant ainsi leur fonction pathogène.

3.2.3 Principe :

Le test des endotoxines bactériennes mesure la concentration des endotoxines bactériennes qui peuvent être présentes dans l'échantillon ou sur l'article auquel le test est appliqué à l'aide d'un lysat provenant des cellules hémolymphes ou des amœbocytes du limule, *Limuluspolyphemus*.

L'addition d'une solution contenant des endotoxines à une solution du lysat produit une turbidité, une précipitation ou une gélification du mélange.

Le taux de réaction dépend de la concentration d'endotoxine, du pH et de la température. La réaction nécessite la présence de certains cations bivalents, d'un système enzymatique et d'une protéine coagulable, l'ensemble est le lysat.

Les quantités d'endotoxines sont exprimées par unités d'endotoxines (EU). Avec l'adoption par le Comité d'experts des normes biologiques de l'OMS de la deuxième norme internationale pour les essais de toxicité, 1EU = 1IU.

3.2.4 Locaux et conditions ambiantes :

L'essai doit être effectué dans une salle propre réservée uniquement à la recherche d'endotoxines, à l'abri des courants d'air et des déplacements du personnel.

La paillasse doit être soigneusement javellisée avant et après l'essai.

Utiliser un matériel exempt d'endotoxines dont la teneur est inférieure à 0.005 EU/ml.

3.2.5 Equipement :

- Agitateur de type vortex
- Bain-marie régler à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sans agitation
- Thermomètre
- Micropipette de précision réglable (10-100 μl)
- Micropipette de précision réglable (100-1000 μl)
- Micropipette de précision fixe 10 μl
- Micropipette de précision fixe 100 μl

3.2.6 Consommables :

- Tubes à réaction en verre certifiés exempt d'endotoxines à fond rond avec un bouchon à vice en polypropylène à usage unique
- Tubes à dilution en verre certifiés exempt d'endotoxines à usage unique
- Embouts en polypropylène certifiés exempt d'endotoxines à usage unique
- Parafilm
- Papier pH
- Portoir pour tube à dilution
- Chronomètre



Figure 16 : Matériels utilisés dans l'essai de recherche.

3.2.7 Réactifs spéciaux :

- ✓ Standard d'endotoxine de référence :

Le standard d'endotoxine de référence est l'endotoxine lyophilisée et purifiée d'*Escherichia coli*, qui est étalonnée en EU par comparaison avec l'étalon international.

- ✓ Lysat :

Le lysat d'amœbocyte de *Limulus polyphemus* est reconstitué comme indiqué sur l'étiquette.

- ✓ Eau qualité LAL :

Eau qui donne un résultat négatif dans les conditions prévues dans l'essai pour les endotoxines bactériennes sur la préparation examinée. Il peut être préparé en distillant trois fois de l'eau dans un appareil équipé d'un dispositif efficace pour empêcher l'entraînement des gouttelettes ou par d'autres moyens donnant de l'eau de la qualité désirée. (Figure 5).

- ✓ Acide chlorhydrique BET 0.1 N
- ✓ Hydroxyde de sodium BET 0.1 N



Figure 17 : Lysat d'amœbocytes de limule et standard de référence d'endotoxines

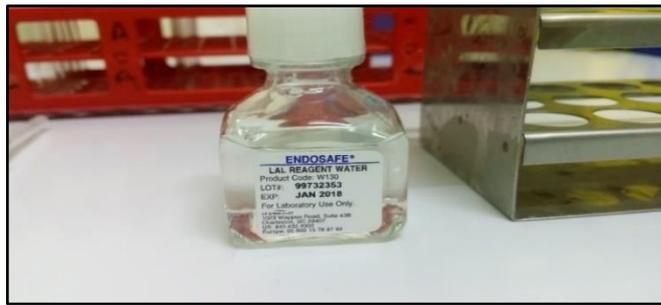


Figure 18 : Eau qualité LAL.

3.2.8. Mode opératoire :

3.2.8.1. Validation de la sensibilité du lysat

La qualification initiale est obligatoire en cas du changement des 5M : méthode, matériel, matière, milieu et manipulateur.

C'est une étape de validation qui consiste à confirmer la sensibilité du lysat déclarée par le fabricant, donc la confirmation d'absence d'endotoxines dans les réactifs utilisés.

3.2.8.1.1. Reconstitution du lysat

- Constituer une solution du lysat avec un volume de 5 ml d'eau qualité LAL ;
- Aliquoter cette solution dans des tubes à réaction de 100 µl/ tube.

La sensibilité de notre lysat déclarée par le fabricant est de $\lambda = 0.03$ UI/ml, elle est définie comme étant la plus faible concentration d'endotoxines que le lysat peut détecter.

3.2.8.1.2. Reconstitution de l'endotoxine

- Reconstituer la solution de l'endotoxine avec de l'eau qualité LAL de façon à obtenir une solution standard d'endotoxines de concentration CSE = 20 UI/ml, à partir de laquelle on prépare une solution de concentration CSE = 0.24 UI/ml soit 8 λ ;

$$\begin{array}{l}
 20 \text{ UI} \longrightarrow 1 \text{ ml} \\
 0.24 \text{ UI} \longrightarrow V
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{l} 20 \text{ UI} \\ 0.24 \text{ UI} \end{array}} \right\}
 V = \frac{0.24 \times 1}{20}
 \longrightarrow
 \boxed{V = 0.012 \text{ ml}}$$

- Pour préparer 2ml de la solution 8λ, prélever 2V soit 0.024 ml de la solution CSE et compléter avec de l'eau qualité LAL jusqu'à 2ml ;

- Agiter au vortex la lyophilisation ainsi reconstituée et la conserver à une température comprise entre +2 et +8 °C.

3.2.8.1.3. Préparation de la gamme d'endotoxines dans l'eau LAL

- A partir de la solution à 0.24 UI/ml soit 8λ, effectuer des dilutions aux ½ soit 4λ, 2λ, λ, λ/2, λ/4 correspondant respectivement à 0.12, 0.06, 0.03, 0.015, 0.0075 UI/ml ;
- Chaque dilution d'endotoxines est agitée pendant 1 min au vortex ;
- Constituer 4 séries de 100 µl de la gamme des dilutions à 4 λ ,2 λ, λ, λ /2, λ /4 ;
- Ajouter à chaque série un tube témoin négatif, constitué de 100 µl d'eau LAL ;
- A chaque 100 µl de la solution ou d'eau LAL contenus dans le tube à réaction, ajouter 100 µl de lysat ;
- Incuber pendant 60 ± 2 min les tubes à réaction dans le bain à sec réglé à 37 ± 1 °C.

Tableau 7 : Séries des dilutions pour la validation initiale

Tubes	Solution à ajoutée	Eau qualité LAL	Concentration d'endotoxine
8λ	0.024ml de CSE	1.967ml	0.24 UI/ml
4λ	1 ml de 8λ	1 ml	0.12 UI/ml
2λ	1 ml de 4λ	1 ml	0.06 UI/ml
λ	1 ml de 2λ	1 ml	0.03 UI/ml
λ/2	1 ml de λ	1 ml	0.015 UI/ml
λ/4	1 ml de λ/2	1 ml	0.75 ml

3.2.8.1.4. Résultat

A la fin de l'essai, sortir les tubes, les retourner lentement et faire la lecture comme indiqué ci-dessous :

- Le test est positif si le gel est ferme et ne se casse pas.
- Le test est négatif si le gel prend un aspect mou ou le mélange reste fluide.

✓ **Détermination du point final**

Le calcul de la sensibilité est réalisé par la détermination du point final :

- Déterminer les points finaux (PF) de chaque série (le point final correspond à la concentration la plus faible qui donne un résultat positif) ;
- Calculer le logarithme décimal de chaque point final ;
- Calculer la moyenne géométrique (MG) des points finaux.

$$MG = \frac{\sum \log PE}{N} \text{ Avec } N = 4$$

- Calculer la sensibilité du lysat

$$\lambda = \text{anti log } MG$$

▪ **Evaluation**

Le technicien, les réactifs et le consommable sont validés vis-à-vis du test si la sensibilité Y calculée est comprise entre $\lambda/2$ et 2λ .

3.2.8.2. Essai final : contrôle des produits à tester

3.2.8.2.1 Reconstitution du lysat :

- Décapsuler le flacon et faire descendre le maximum de lyophilisat au fond du flacon ;
- Avec un instrument stérile (embout exempt d'endotoxines), soulever lentement le bouchon pour casser le vide et reconstituer le lysat avec un volume d'eau qualité LAL comme indiqué par le fabricant ;
- Reboucher le flacon immédiatement avec du parafilm coté papier protecteur, puis homogénéiser à la main avec des mouvements en 8 (il faut éviter la formation de mousse) ;
- Répartir la solution ainsi reconstituée dans des tubes à réaction à raison de 100 µl par tube ;

- Incréments sur ces tubes, la date de reconstitution du lysat, ainsi que sa sensibilité ;
- Conserver ces tubes à une température de 2 à 8 °C pendant 24h, ou au congélateur pendant 28 jours ;
- Avant chaque utilisation, retirer le(s) tube(s) et décongeler le lysat à température ambiante afin d'éviter toute destruction protéique.

3.2.8.2.2. Reconstitution de l'endotoxine

- Décapsuler le flacon de CSE et faire descendre le maximum de lyophilisat au fond du flacon ;
- Avec un instrument stérile exempt d'endotoxines, soulever lentement le bouchon pour casser le vide et reconstituer l'endotoxine avec un volume d'eau qualité LAL ;
- Fermer le flacon avec un carré de film protecteur ;
- Agiter au vortex la solution d'endotoxines ainsi reconstituée et conserver entre +2 et +8 °C.

NB : Avant chaque manipulation, la solution mère d'endotoxines doit être agitée au vortex car les endotoxines adhèrent aux parois du flacon.

3.2.8.2.3. Préparation des échantillons :

On prélève des quantités suffisantes d'**insuline detemir** et l'**insuline aspartate/aspartate cristallisé** qu'on transvase dans deux béchers et recouverts par du parafilm.

3.2.8.2.4. Caractérisation des échantillons :

➤ DMS = Dilution Maximale Significative

La DMS est une dilution maximale qui permet de s'assurer que le produit non dilué ne déclenche pas de réactions indésirables, si le résultat du test mené à cette dilution est négatif.

En cas de test positif, le produit non dilué renferme une concentration d'endotoxines suffisante pour entraîner des effets indésirables.

$$\text{DMS} = \frac{\text{LE}}{\lambda} \times C \quad \text{Avec :} \quad \text{LE} = \frac{K}{M}$$

- **LE**: concentration limite en endotoxine d'une substance administrée par voie parentérale, exprimée en UI/mg ou UI/unité d'activité biologique.
- **K** : dose seuil d'endotoxines en UI/ kg/ h qu'un patient peut recevoir sans effets toxiques, sa valeur dépend de la voie d'administration.
 - Voie intraveineuse (IV) : $k = 5 \text{ UI/ kg/ h}$.
 - Produits radio pharmaceutiques administrés par voie IV = 2.5 UI/ kg/ h .
 - Voie intrarachidienne : $k = 0.2 \text{ UI/ kg/ h}$.
- **M** : dose maximale humaine de produit (pour un homme de 60kg) en mg ou UI/ kg/ h par kg, administré par la voie prévue.
- **C** : concentration du produit en mg/ ml, UI/ ml ou ml/ ml.
- λ : sensibilité du lysat exprimé en UI/ ml.

3.2.8.2.5. Calcul de la dilution maximale significative

$$\text{DMS} = \frac{\text{LE}}{\lambda} \times \text{C} \quad \text{Avec : } \text{LE} = \frac{\text{K}}{\text{M}}$$

- **M** : dose maximale du produit testé = $0,0625 \text{ UI/kg/h}$.
- **C** : concentration du produit = 100 UI
- **K** = 5 UI/ kg/ h
- $\lambda = 0.03 \text{ UI/ ml}$.

$$\text{LE} = \frac{5}{0,0625} \Rightarrow \boxed{\text{LE} = 80 \text{ EU/ml}}$$

$$\text{DMS} = \frac{80}{0.03} \times 100 \Rightarrow \boxed{\text{DMS} = 2666.66}$$

- **Dilution testée (DT)** : on utilisera une dilution de 1/100 pour faciliter la manipulation.

3.2.8.2.6. Préparation de la dilution

la préparation de la dilution testée $\frac{1}{100}$ pour chaque molécule (**d'insuline détemir** et **l'insuline aspartate/aspartate cristallisé**) a été effectuée en mélangeant 10 μ l du produit à tester avec 990 μ l de l'eau qualité LAL puis agiter au vortex.

3.2.8.2.7. Mesure du PH

Le pH de la dilution de chaque échantillon est mesuré à l'aide de papier PH, il doit être compris entre 6 et 8 ;

Dans le cas contraire le pH est ajusté avec du NaOH ou du HCL à 0.1N exempts d'endotoxines bactériennes car selon la pharmacopée européenne la gélification est optimale lorsque le mélange présente un PH compris entre 6,0 et 8,0.

3.2.8.2.8. Préparation de la surcharge

Nous avons préparé une solution surchargée à 2 λ /ml soit 0.06 UI/ml, à partir de notre contrôle standard d'endotoxines à 20 UI/ ml.

- **Le volume à prélever du CSE :**

$$\begin{array}{l}
 20 \text{ UI} \longrightarrow 1 \text{ ml} \\
 0.06 \text{ UI} \longrightarrow V
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{l} 20 \text{ UI} \\ 0.06 \text{ UI} \end{array}} \right\}
 \quad
 V = \frac{0.06 \times 1}{20}
 \quad
 \longrightarrow
 \quad
 \boxed{V = 3 \mu\text{l}}$$

- Prélever 3 μ l de CSE et compléter jusqu'à 1 ml pour avoir une solution surchargée à 2 λ ;
- Agiter au vortex le CSE avant et après l'utilisation.

3.2.8.3 Essai proprement dit :

- ✓ Préparation des solutions d'insuline diluées :
 - On prend 10 μ l d'insuline NOVOMIX et qu'on dilue avec 990 μ l d'eau BET dans un tube a dilution.
 - On refait la même chose avec l'insuline LEVEMIR.
- ✓ Préparation des tubes :

- On prépare les tubes comme suit :
 - Un tube contrôle négatif (Eau LAL + Lysat);
 - Un tube contrôle positif surchargé à 2λ d'endotoxines dans l'eau LAL + Lysat ;
 - Deux tubes de **l'insuline aspartate/aspartate cristallisé** à la dilution testée DT + Lysat ;
 - Deux tubes de **l'insuline aspartate/aspartate cristallisé** à la dilution testée surchargés par 2 λ d'endotoxines + Lysat;
 - Deux tubes de **l'insuline détemir** à la dilution testée DT + Lysat ;
 - Deux tubes de **l'insuline détemir** à la dilution testée surchargés par 2 λ d'endotoxines + Lysat.

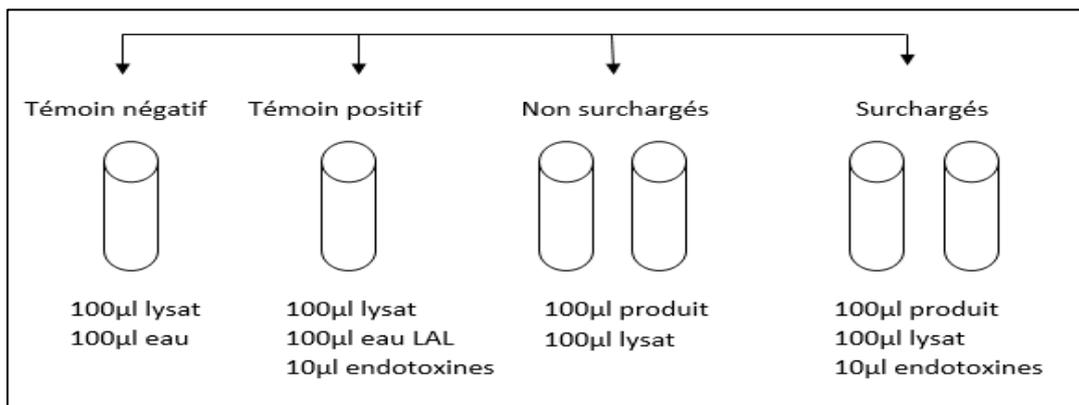


Figure 19 : Schéma récapitulatif de l'essai final.

- Bien mélanger les tubes avec le vortex après chaque ajout de solution.
- Incuber les tubes à 37 °C pendant 1heure dans un bain à sec sans agitation.



Figure 20 : Incubation des tubes à 37°C pendant 1 h.

- L'essai est résumé dans le tableau qui suit :

Tableau 8 : Préparation des dilutions pour l'essai final du LAL test.

Réactif Tubes	Réactif			
	lysat	Eau qualité LAL	Echantillon	Surcharge
Contrôle négatif	100µl	100µl	-	-
Contrôle positif	100µl	100µl	-	10µl
Deux tubes de l'insuline aspartate/aspartate cristallisé surchargé	100µl	-	100µl	10µl
Deux tubes de l'insuline détemir surchargé	100µl	-	100µl	10µl
Deux tubes de l'insuline aspartate/aspartate cristallisé à contrôler à la DT	100µl	-	100µl	-
Deux tubes de l'insuline détemir à contrôler à la DT	100µl	-	100µl	-

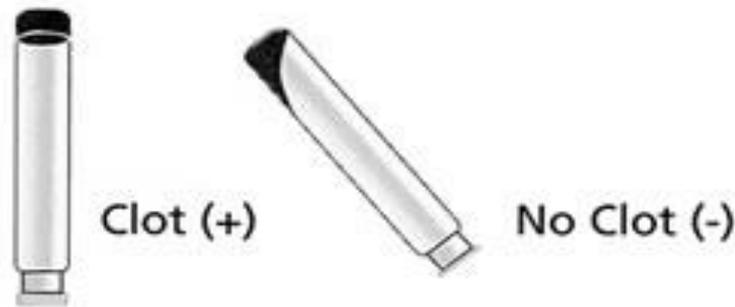
✓ **Intérêt des tubes:**

- Tube contrôle négatif : afin de vérifier la qualité de l'eau LAL
- Tube contrôle positif : pour tester la sensibilité du lysat
- Tubes des produits à tester à la dilution testée DT + Lysat : pour tester le produit
- Tubes des produits à tester surchargés par 2 λ d'endotoxines + Lysat : Pour démontrer que la préparation d'essai n'inhibe pas, n'accentue pas la réaction ou bien ne perturbe pas l'essai.

✓ **Lecture des résultats**

Après 1 heure d'incubation au bain marie à 37°C, Sortir les tubes, les retourner lentement et observer une :

- Réaction positive : si formation d'un gel qui ne se casse pas lorsqu'on retourne le tube.
- Réaction négative : si absence de gel ou formation d'un gel mou qui se casse lors du retournement.



✓ Normes et interprétation

- L'essai est valable si :
 - Le contrôle négatif ne forme pas de gel.
 - Le contrôle positif et les deux tubes produits surchargés donnent un résultat positif.
- Si les deux tubes produits à contrôler non surchargés donnent une réaction négative : l'échantillon testé, renferme moins de la valeur limite d'endotoxines (LE) : le produit est conforme.
- Si les deux tubes produits à contrôler non surchargés donnent une réaction positive : l'échantillon testé, renferme plus de la valeur limite d'endotoxines (LE) : le produit est non conforme.
- Si un seul des tubes produits à contrôler non surchargés est positif, répéter l'essai :
 - Si les deux tubes des produits à contrôler non surchargés sont positifs, le produit est non conforme.
 - Si un des tubes des produits à contrôler non surchargés est positif, le produit est non conforme.
 - Si les deux tubes des produits à contrôler non surchargés sont négatifs, le produit est conforme.

4. Evaluation de l'activité hypoglycémiante de l'insuline

4.1 Introduction : L'activité hypoglycémique de l'insuline a été testée in vivo sur des souris, selon un protocole élaboré en se référant aux différents protocoles existants et leurs faisabilités sur le terrain.

4.2 Objectifs :

Détermination de l'effet hypoglycémiant de deux types d'insuline (**détemir** et **aspartate/aspartate cristallisée**) ainsi que leurs cinétiques d'action.

4.3 Principe :

- Il consiste en l'injection de doses connues d'insuline sur des souris.
- Détermination des taux de glycémies chez ces dernières dans des temps définis : 1H, 2H, 4H et 6H après l'injection.
- Suivre l'évolution des taux de glycémie en traçant les courbes correspondantes à chaque insuline.
- Les courbes qui représentent l'évolution du taux de glycémies en fonction du temps représentent la cinétique d'action de l'insuline **détemir** et insuline **aspartate/aspartate cristallisée** en cours d'examen.
- Comparer les résultats obtenus par rapports aux résultats obtenus du lot témoin.

4.4 Locaux et conditions ambiantes :

L'essai est effectué dans un lieu tranquille ou aucune perturbation ne risque d'exciter les animaux.

4.5 Matériels

4.5.1 Equipements :

- Boites à contention pour souris.
- Balance pour la pesée des animaux.
- Réfrigérateur pour la conservation de l'insuline.
- Agitateur magnétique.

4.5.2 Consommables :

- Seringue à insuline de 1ml.
- Compresses.
- Aiguilles de seringues.
- Micropipettes.
- Fioles.
- Eprouvettes.
- Bêchers.
- Glucomètre ACCU-CHEK
- Bandelettes pour glucomètre.
- Lames.

4.5.3 Réactifs

✓ Réactifs chimiques :

- Eau physiologique.
- Insuline **détemir** (100UI /ml).
- Insuline **aspartate/aspartate cristallisée** (100UI/ml).

✓ Réactifs biologiques :

- Souris pesant entre 17et 22 g
- Sexe : femelle
- Nombre : 18, réparties en 3 lots de 6 souris chacun
- Poids : voir annexe 2.



Figure 21 : Lots de souris utilisés.

4.6 Mode opératoire :

4.6.1 Préparation des animaux :

-Sélectionner 18 souris saines pesant entre 17 et 22 g réparties en 3 lots :

- Lot témoin : qui recevra l'injection d'eau physiologique.
- Lot 2 : qui recevra l'injection d'insuline **détemir**.
- Lot 3 : qui recevra l'injection d'insuline **aspartate/aspartate cristallisée**

-Les souris doivent observées une période de jeun avant (au moins 6h) et pendant toute la durée du protocole.

4.6.2 Préparation des solutions d'insuline :

Calcul de la dose à injecter pour chaque souris :

➤ Insuline aspartate/aspartate cristallisée:

On utilisera une dose de 0,25 UI / Kg. Donc, pour une souris de poids moyen de 20 g, on calcule la quantité à administrer :

$$\left. \begin{array}{l} 0,25 \text{ UI} \longrightarrow 1000\text{g} \\ x \text{ UI} \longrightarrow 20\text{g} \end{array} \right\} X = 0,25 * 20 / 1000 = 0,005 \text{ UI}$$

Le volume à injecter est de 0,5ml.

Donc, la dose à injecter est de : 0,005UI/0,5ml = **0,01UI/ml**.

Pour obtenir une solution de 0,01UI/ml (solution de travail), on procède à des dilutions successives d'une solution de 1UI/ml (solution fille 1) obtenue à partir du stylo d'insuline aspartate/aspartate cristallisée.

❖ Préparation de la solution fille 1 de 1UI/ml :

Calcule du volume à prélever à partir du stylo :

$$V_1 = C_2 V_2 / C_1$$

V_1 : volume à prélever

C_1 : concentration de l'insuline dans le stylo

C_2 : concentration de la solution fille

V_2 : volume de la solution fille (10ml)

$$V_1 = 1 * 10 / 100$$

$$V_1 = 0,1\text{ml} = 100\mu\text{l}$$

Le volume à prélever du stylo est de 100 μl qu'on complète avec 9,9ml d'eau physiologique.

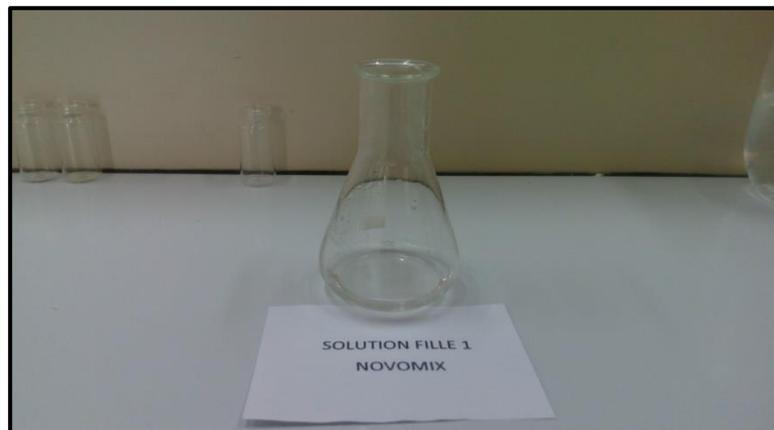


Figure 22 : Solution fille 1 d'insuline aspartate/aspartate cristallisée.

❖ Préparation de la solution fille 2 (solution de travail) :

A partir de la solution fille 1, on prélève 1ml qu'on dilue dans 10ml d'eau physiologique (dilution au 1/10) puis on refait la même dilution à partir de cette dernière pour obtenir une solution à 0,01UI/ml.

NB : après chaque dilution, on agite bien les solutions dans l'agitateur magnétique.

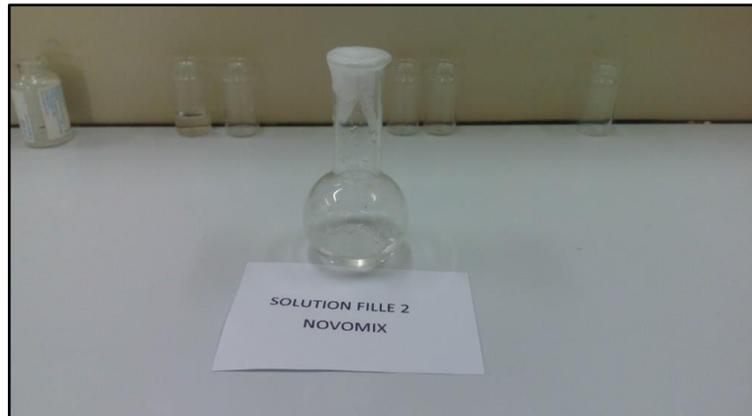


Figure 23 : Solution fille 2 d'insuline aspartate/aspartate cristallisée.

➤ Insuline **détemir** :

On utilise la dose de 0,2 UI / Kg. Donc, pour une souris de poids moyen de 20 g, on calcule la quantité à administrer :

$$\left. \begin{array}{l} 0,2 \text{ UI} \longrightarrow 1000\text{g} \\ x \text{ UI} \longrightarrow 20\text{g} \end{array} \right\} X = 0,2 * 20 / 1000 = 0,004 \text{UI}$$

Le volume à injecter est de 0,5ml.

Donc, la dose à injecter est de : $0,004 \text{UI} / 0,5 \text{ml} = \mathbf{0,008 \text{UI/ml}}$.

Pour obtenir une solution de 0,008UI/ml (solution de travail), on procède à des dilutions consécutives d'une solution de 0,8UI/ml (solution fille 1) obtenue à partir du stylo d'insuline **détemir**.

❖ Préparation de la solution fille 1:

Calcule du volume à prélever à partir du stylo :

$$V_1 = C_2 V_2 / C_1$$

$$V_1 = 0,8 * 10 / 100$$

$$V_1 = \mathbf{0,08 \text{ml} = 80 \mu\text{l}}$$

V_1 : volume à prélever

C_1 : concentration de l'insuline dans le stylo

C_2 : concentration de la solution fille

V_2 : volume de la solution fille (10ml)

Le volume à prélever du stylo est de 80 μ l qu'on complète avec 9,92ml d'eau physiologique.



Figure 24 : Solution fille 1 d'insuline détemir.

❖ Préparation de la solution fille 2 (solution de travail) :

A partir de la solution fille 1, on prélève 1ml qu'on dilue dans 10ml d'eau physiologique (dilution au 1/10) puis on refait la même dilution à partir de cette dernière pour obtenir une solution à 0,008UI /ml.

NB : après chaque dilution, on agite bien les solutions dans l'agitateur magnétique.



Figure 25 : Solution fille 2 d'insuline détemir.

3.1.7 Protocole :

- La glycémie des souris des 3 lots a été mesurée sur une goutte de sang prélevée à partir de l'extrémité caudale des animaux.
- Avant toute administration, on détermine pour chaque souris le taux de glycémie (T0).



Figure 26 : Glycémie à T0

- On injecte 0,5 ml de nos solutions de travail pour chaque lot correspondant toute en précisons le temps de l'injection.



Figure 27 : Injection des préparations d'insuline.

- On détermine les taux de glycémie pour chaque souris après 1h, 2h, 4h et 6h à l'aide du glucomètre.

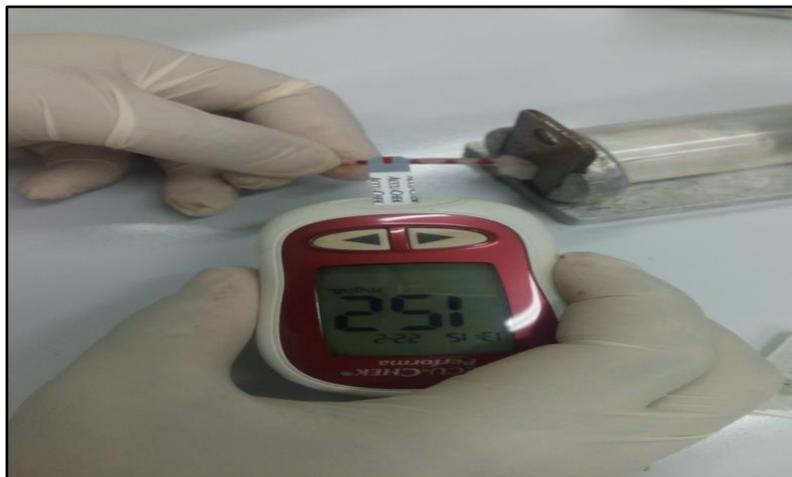


Figure 28 : mesure des taux de glycémie aux différents temps.

4.7. Expression et analyse des résultats:

L'analyse des résultats obtenus s'est faite de deux manières

4.7.1. L'analyse de la variance ANOVA :

Les valeurs de la glycémie sont exprimées sous la forme moyenne \pm erreur standard à la moyenne. L'analyse de la variance (ANOVA) applicable aux comparaisons multiples des données ainsi que l'analyse de l'erreur type ont été utilisés pour les analyses statistiques à l'aide du logiciel EXCEL 2016. La variation de glycémie était considérée significative au seuil de $P < 0,05$.

4.7.1.1. Définition du test d'ANOVA :

C'est la comparaison de moyennes pour plusieurs groupes (> 2). Il s'agit de comparer la variance intergroupe (entre les différents groupes : écart des moyennes des groupes à la moyenne totale) à la variance intragroupe (somme des fluctuations dans chaque groupe). Les variances correspondantes sont obtenues par la somme des carrés divisés par le nombre de degrés de liberté, appelée aussi moyenne des sommes des carrés.

Ce test va nous permettre de comparer entre les moyennes des glycémies des trois lots, le lot témoin, le lot ayant reçu l'insuline détemir et le lot ayant reçu l'insuline en fonction du temps. Pour cela on doit formuler deux hypothèses statistiques à chaque temps.

- À T0 : on compare les moyennes des glycémies des trois groupes avant administration de l'insuline. On pose les deux hypothèses statistiques :

L'hypothèse nulle ou H_0 : il n'existe pas de différence significative entre les moyennes des glycémies des trois groupes à T0.

L'hypothèse alternative ou H_1 : il existe une différence significative entre les moyennes des glycémies des trois groupes à T0.

- À T1 : on compare les moyennes des glycémies des trois groupes une heure après l'administration de l'insuline. On pose les deux hypothèses statistiques :

L'hypothèse nulle ou H_0 : il n'existe pas de différence significative entre les moyennes des glycémies des trois groupes à T1.

L'hypothèse alternative ou H_1 : il existe une différence significative entre les moyennes des glycémies des trois groupes à T1.

- À T2 : on compare les moyennes des glycémies des trois groupes deux heures après l'administration de l'insuline. On pose les deux hypothèses statistiques :

L'hypothèse nulle ou H_0 : il n'existe pas de différence significative entre les moyennes des glycémies des trois groupes à T2.

L'hypothèse alternative ou H_1 : il existe une différence significative entre les moyennes des glycémies des trois groupes à T2.

- À T4 : on compare les moyennes des glycémies des trois groupes quatre heures après l'administration de l'insuline. On pose les deux hypothèses statistiques :

L'hypothèse nulle ou H_0 : il n'existe pas de différence significative entre les moyennes des glycémies des trois groupes à T4.

L'hypothèse alternative ou H_1 : il existe une différence significative entre les moyennes des glycémies des trois groupes à T4.

- À T6 : on compare les moyennes des glycémies des trois groupes six heures après l'administration de l'insuline. On pose les deux hypothèses statistiques :

L'hypothèse nulle ou H_0 : il n'existe pas de différence significative entre les moyennes des glycémies des trois groupes à T6.

L'hypothèse alternative ou H_1 : il existe une différence significative entre les moyennes des glycémies des trois groupes à T6.

- Le test est réalisé pour un seuil de signification de 5%.

4.7.1.2. Erreur standard :

Afin de déterminer la précision de notre test ainsi qu'à quel point nos données obtenues sont bonnes, on procède à la détermination de l'erreur type de la moyenne ou « standard error ».

La formule est définie comme suit :

$$\sigma/\sqrt{n}$$

Où σ représente l'écart type et n l'effectif.

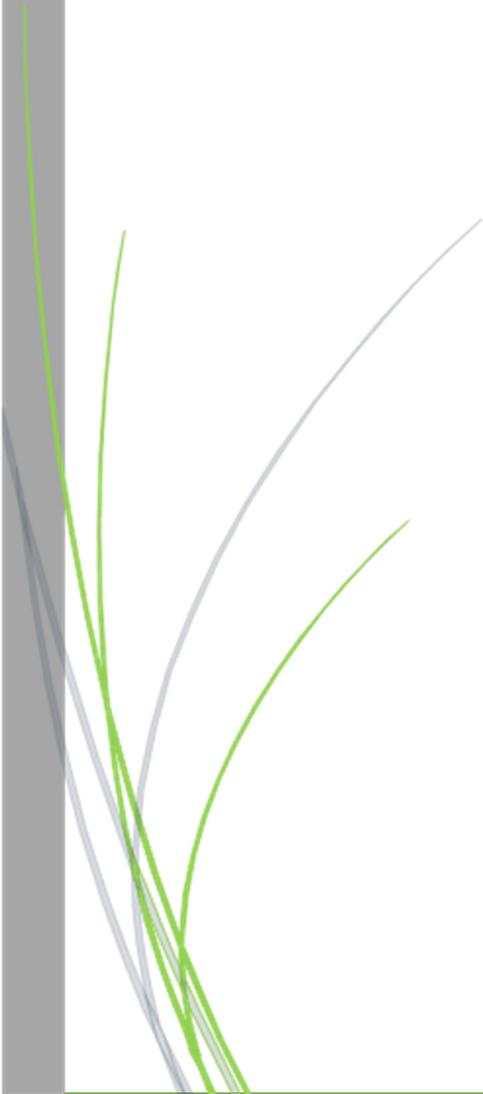
On la calcule pour chaque type d'insuline et aux temps différents.

4.7.2. Calcul du pourcentage de variation de la glycémie en fonction du taux initial :

Les pourcentages de réduction sont calculés en soustrayant les taux de glycémie obtenus à chaque temps, du taux de glycémie de base puis en multipliant par 100 afin d'obtenir un pourcentage.



RESULTATS



II. LES RESULTATS

1. test de toxicité anormale :

Le test est acceptable si aucune des souris ne meurt dans les 24 heures ou si elles ne présentent pas une perte de poids.

- La substance échoue le test si plus d'une souris meurt.
- Si l'un des animaux meurt répétez le test, la substance passe le test si aucun des animaux dans le second groupe meurt.
- Si plusieurs animaux meurent, la substance échoue au test.

✓ Les observations ont été faites pendant 24 heures après l'administration de l'insuline, et sont notées dans le tableau 1 :

Tableau 9 : Evolution pondérale et observations après 24 h.

Insulines	N°SOURIS	POIDS (avant administration) (g)	Evolution pondéral (Après 24h)	Observation après 24h
NOVOMIX	1	19.4	19.7	Absence de toxicité particulière
	2	17.6	19.4	
	3	20.5	21.8	
	4	19.5	20.5	
	5	17.8	18.5	
LEVEMIR	1	17.3	17.9	Absence de toxicité particulière
	2	18.2	18.2	
	3	17.8	18.5	
	4	21.7	21.7	
	5	18	18.1	

2. Recherche d'endotoxines bactérienne

2.1. Résultat de la validation initiale :

2.1.1. Détermination du point final :

Tableau 10 : Détermination des points finaux et les logarithmes des points finaux.

UI/ml	4λ	2λ	λ	$\frac{1}{2}\lambda$	$\frac{1}{4}\lambda$	0	Point final	Log point final
Série	0.12	0.06	0.03	0.015	0.0075			
01	+	+	+	-	-	-	0.03	-1.5228
02	+	+	+	-	-	-	0.03	-1.5228
03	+	+	+	-	-	-	0.03	-1.5228
04	+	+	+	-	-	-	0.03	-1.5228

- Calcul de la moyenne géométrique des logs des points finaux:

$$MG = \frac{\sum \log PF}{N} \text{ avec } N = 4$$

$$MG = \frac{-1.5228 - 1.5228 - 1.5228 - 1.5228}{4}$$

$$MG = -1.5228$$

- Calcule de la sensibilité du lysat :

$$\lambda = \text{ANTI LOG } MG$$

$$\lambda = \text{ANTI LOG } -1.5228$$

$$\lambda = 0.03 \text{ UI/ml}$$

La sensibilité du lysat est de 0.03 UI/ml, elle est identique à la sensibilité déclarée par le fabricant.

La sensibilité de notre lysat est comprise entre $\lambda / 2 < 0.03 \text{ UI/ml} < 2\lambda$. Donc, notre lysat est **valide** et peut être utilisé pour la manipulation.

NB : la sensibilité de notre lysat est de 0.03UI/ml, cela veut dire que si on met notre lysat en contact avec un produit au même volume et que ce dernier contient plus de 0.03 UI/ml d'endotoxines, il y'aura formation de gel.

2.2. Résultats de l'insuline détemir :

2.2.1. Mesure du pH :

Le pH obtenu de notre solution à tester est de 7.



Figure 29 : détermination du pH de l'insuline détemir.

2.2.2. Résultats finales :

Tableau 11 : résultats du LAL test de l'insuline détemir.

Tubes	Formation d'un gel	Résultats
Contrôle négatif	Absence	Négatif
Contrôle positif	Présence	positif
Insuline détemir surchargé	Présence	positif
Insuline détemir surcharge	Présence	positif
Insuline détemir à contrôler à la DT	Absence	Négatif

Insuline détemir à contrôler à la DT	Absence	Négatif
---	---------	---------

2.3. Résultats de l'insuline aspartate/aspartate cristallisée :

2.3.1. Mesure du pH :

Le pH obtenu de notre solution à tester est de 7.



Figure 30 : détermination du pH de l'insuline aspartate/aspartate cristallisée.

2.3.2. Résultats finales :

Tableau 12 : résultats du LAL test de l'insuline aspartate/aspartate cristallisée.

Tubes	Formation d'un gel	Résultats
Contrôle négatif	Absence	Négatif
Contrôle positif	Présence	positif
Insuline aspartate/aspartate cristallisée surchargé	Présence	positif
Insuline aspartate/aspartate cristallisée surcharge	Présence	positif
Insuline aspartate/aspartate cristallisée à contrôler à la DT	Absence	Négatif
Insuline aspartate/aspartate cristallisée à contrôler à la DT	Absence	Négatif

3. Activité hypoglycémique de l'insuline :

Les taux de glycémie obtenues pour chaque souris ainsi que leur poids sont mentionnés dans l'annexe 2.

Le tableau 13 représente l'évolution de la valeur moyenne de la glycémie des souris en fonction du traitement.

Tableau 13 : Evolution de la valeur moyenne de la glycémie en fonction du type d'insuline.

Types d'insuline	T0	T1	T2	T4	T6
Insuline aspartate/aspartate cristallisée	1,36 ± 0,07	0,99 ± 0,08	0,585 ± 0,10	1,158 ± 0,08	1,07 ± 0,06
Détemir	1,40 ± 0,03	1,22 ± 0,09	1,03 ± 0,05	0,91 ± 0,04	0,86 ± 0,04
Témoin	1,51 ± 0,01	1,44 ± 0,08	1,25 ± 0,07	1,22 ± 0,127	1,1 ± 0,11

Les figures suivantes représentent les graphes correspondants à l'évolution de la glycémie en fonction du type d'insuline.

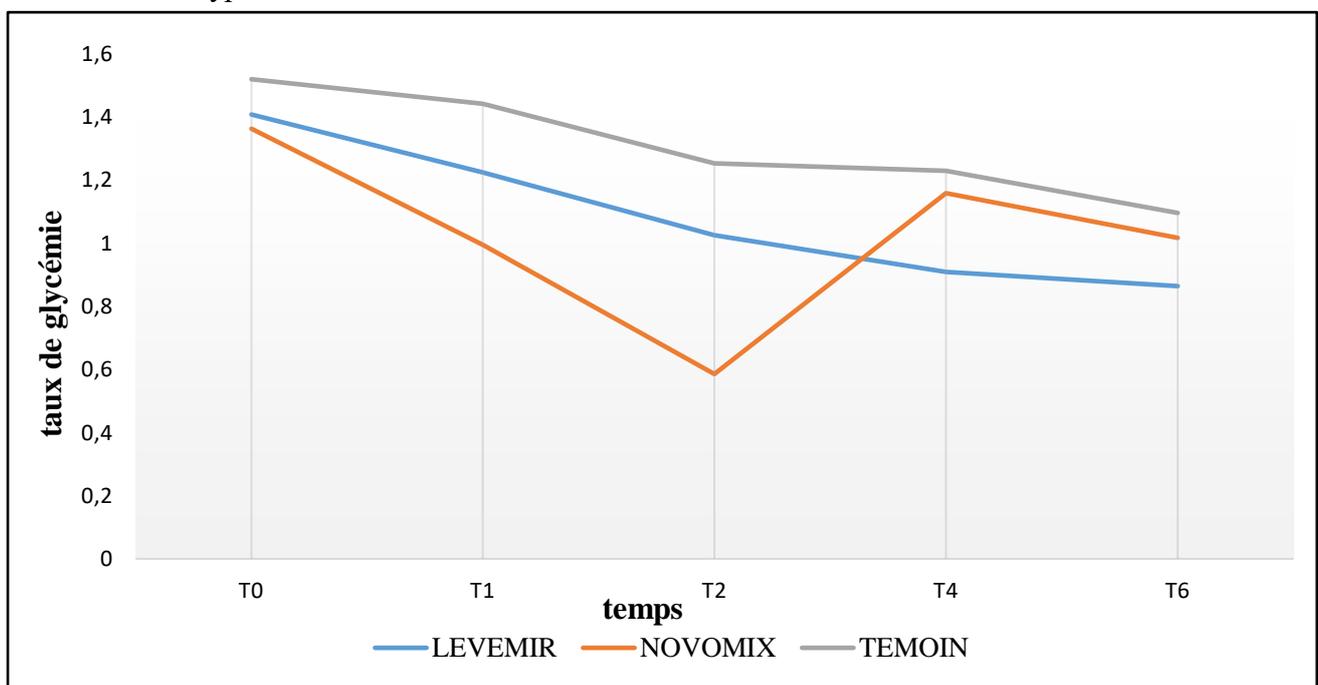


Figure 31 : représentation graphiques de l'évolution des taux de glycémie.

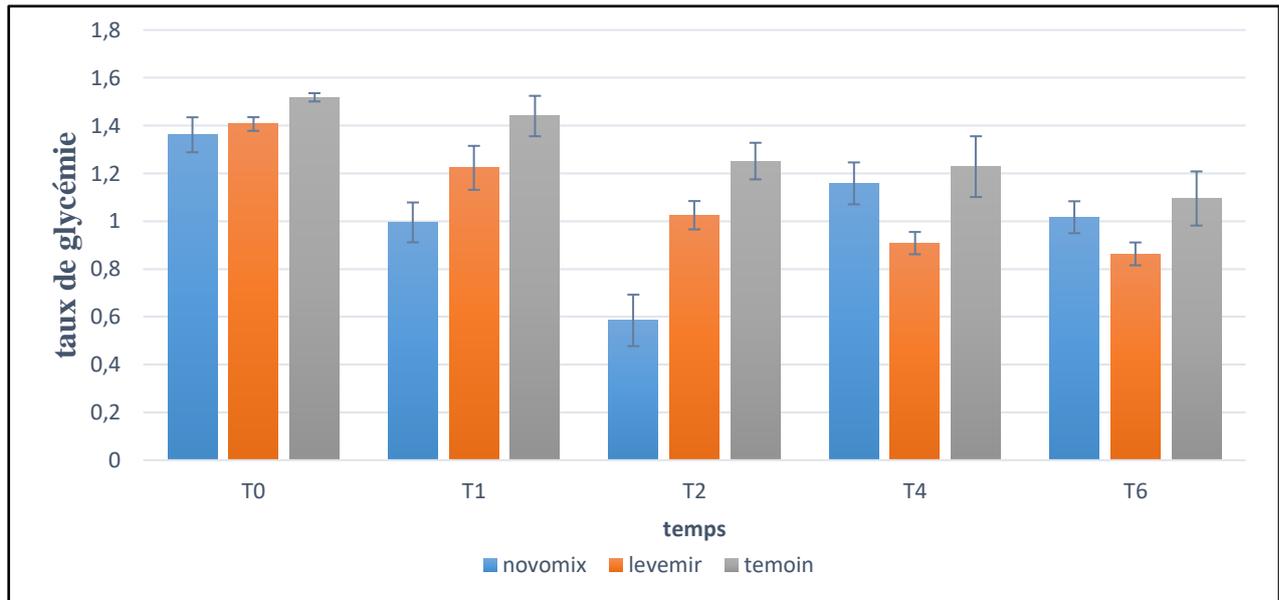


Figure 32 : variation des taux de glycémie avec représentation des barres d'erreur.

Les résultats de l'analyse ANOVA :

Les résultats détaillés du test sont mentionnés dans l'annexe 3.

Afin d'interpréter les résultats de l'ANOVA, on s'appuiera sur trois valeurs critiques du test à savoir : F, Probabilité, valeur critique de F. si on aura $P < 0.05$, l'hypothèse H_0 sera rejeté et l'hypothèse H_1 sera retenu et le contraire est juste.

✓ A T0 :

F	Probabilité	Valeur critique de F	Conclusion
3,010711225	0,079564382	3,682320344	L'hypothèse H_0 retenue.

Il n'y a pas de différence significative entre les moyennes des glycémies des trois groupes au temps T0.

✓ A T1 :

F	Probabilité	Valeur critique de F	Conclusion
6,583975574	0,00886176	3,682320344	L'hypothèse H_0 rejeté

Il y'a une différence significative entre les moyennes des glycémies des trois groupes au temps T1.

✓ A T2 :

F	Probabilité	Valeur critique de F	Conclusion
16,41524908	0,00016707	3,682320344	L'hypothèse H0 rejeté

Il y'a une différence significative entre les moyennes des glycémies des trois groupes au temps T2.

✓ A T4 :

F	Probabilité	Valeur critique de F	Conclusion
3,261830057	0,066652049	3,682320344	L'hypothèse H0 retenue

Il n'y a pas de différence significative entre les moyennes des glycémies des trois groupes au temps T4.

✓ A T6 :

F	Probabilité	Valeur critique de F	Conclusion
2,129711153	0,153412244	3,682320344	L'hypothèse H0 retenue

Il n'y a pas de différence significative entre les moyennes des glycémies des trois groupes au temps T6.

Pourcentage de variation de la glycémie en fonction du taux initial :

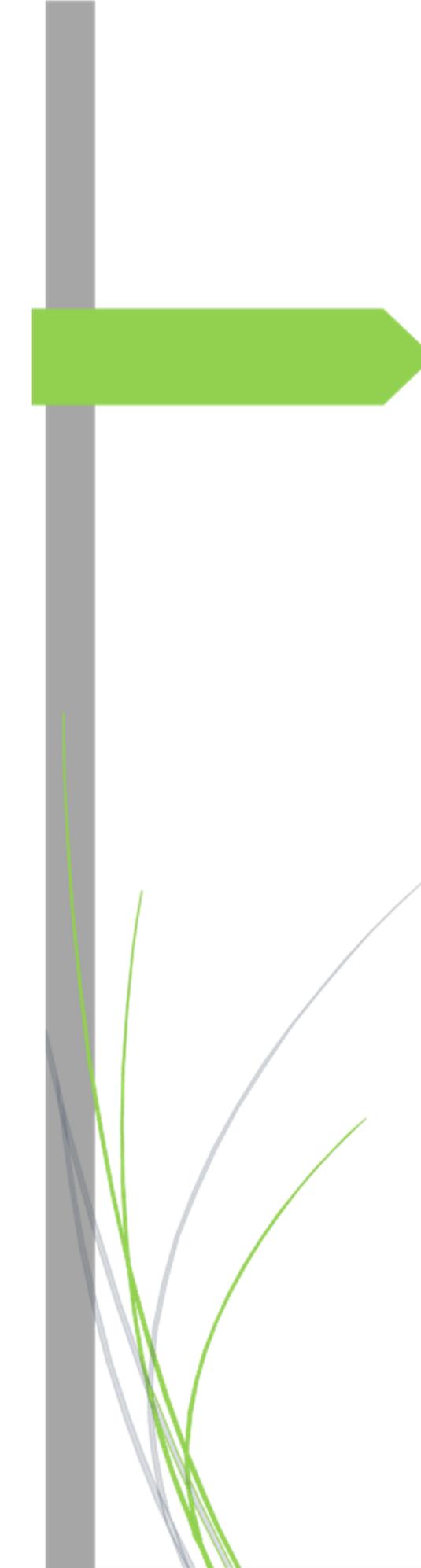
Les résultats des calculs des pourcentages de variation de la glycémie en fonction du taux initial sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 14 : Pourcentage de variation de la glycémie en fonction du taux initial.

Types d'insuline	T1	T2	T4	T6
Insuline aspartate/aspartate cristallisée	-27%	-57%	-14%	-25%
Détemir	-13%	-27%	-35%	-39%
Témoin	-5%	-17%	-19%	-27%

D'après les résultats obtenus, on constate une baisse de la glycémie de base après injection des deux types d'insuline. En effet, pour **l'insuline détemir**, on observe une baisse de 27% au bout de deux heures puis de 39% entre la deuxième heure et la sixième heure après injection.

En ce qui concerne **l'insuline aspartate/aspartate cristallisé**, on observe une réduction de la glycémie de base de 57% au bout de deux heures puis de 14% après quatre heures et enfin de 25% après six heures de l'injection.



DISCUSSION GENERALE

III. DISCUSSION GENERALE:

1. L'évaluation de la toxicité anormale :

- ✓ D'après les observations faites après 24 heures, aucune souris ne présente une réponse qui n'est pas spécifique ou inattendue du produit ou qui peut indiquer une différence de qualité.
- ✓ Aucun animale n'est mort pendant le test, on pourrait conclure que les **insulines aspartate/aspartate cristallisée** et **détemir** testés ne présentent aucune toxicité anormale et donc, **ils sont conformes**.

Depuis les année 1900 où il a été développé, le test de toxicité anormale nous permettaient d'identifier des réactions indésirables potentiellement nocives en utilisant des souris.

Lorsque les alternatives aux tests sur les animaux sont devenues un sujet dans le domaine des produits biologiques, le TCA a été l'un des premiers tests concernés. Nombreux articles ont révélé que aucune conclusion fiable pouvait être tiré du test de la toxicité anormale.

Lors de sa 159e session plénière, tenue à Strasbourg du 21 au 22 novembre 2017, la Commission européenne de Pharmacopée a approuvé la suppression complète du test de toxicité anormale de la Pharmacopée européenne en appuyant se le fait que :

- La production pharmaceutique et installations de fabrication sont en conformité avec les bonnes pratiques de fabrication pour la détection et le contrôle des contaminations.
- Le test de toxicité anormale ne peut plus être valider par rapport aux caractéristiques de validation moderne à savoir la spécificité, reproductibilité et limite de détection.
- L'usage des animaux n'est pas en conformité avec la protection des animaux.
- La FDA américaine a supprimer l'exigence du test général de la toxicité anormale pour les produits biologiques. [34]

2. La recherche des endotoxines bactériennes :

2.1. Résultats de l'insuline détemir :

Le contrôle négatif donne un résultat négatif, l'eau qualité LAL ne contiendrait pas d'endotoxine et ne présenterait aucune contamination.

Le contrôle positif donne un résultat positif, la surcharge est de bonne qualité.

Les deux tubes du **l'insuline détemir** surchargé donnent des résultats positifs, absence de facteurs inhibiteur de la réaction.

Les deux tubes **l'insuline détemir** à contrôler donnent des résultats négatifs, l'échantillon testé renferme une quantité d'endotoxine inférieur à la limite d'endotoxines autorisée.

Notre **insuline détemir** testée **est conforme**.

2.2. Résultats de l'insuline aspartate/aspartate cristallisé :

Le contrôle négatif donne un résultat négatif, l'eau qualité LAL ne contiendrait pas d'endotoxine et ne présenterait aucune contamination.

Le contrôle positif donne un résultat positif, la surcharge est de bonne qualité.

Les deux tubes du **l'insuline aspartate/aspartate cristallisé** surchargé donnent des résultats positifs, absence de facteurs inhibiteur de la réaction.

Les deux tubes **l'insuline aspartate/aspartate cristallisé** à contrôler donnent des résultats négatifs, l'échantillon testé renferme une quantité d'endotoxine inférieur à la limite d'endotoxines autorisée.

Notre **l'insuline aspartate/aspartate cristallisé** testée **est conforme**.

Les pharmacopées internationales ont recommandé le test du lysat d'Amibocytes de Limulus comme méthode de détection des toxines bactériennes tant dans les matières premières utilisées pour la production de médicaments que dans les produits finaux.

Il est parfois appelé test de pyrogène et fait parties de l'une des méthodes alternatives à l'expérimentation sur les animaux. Cependant, le test LAL n'est valable que pour la détection des endotoxines et non pour tout autre type de pyrogène. Dans de nombreuses occasions, ce test a été utiliser dans le but de détecter d'autres pyrogènes, ce qui n'a pas réussi.

Dans notre étude, après avoir réalisé le test LAL sur nos deux produits à savoir **l'insuline détemir** et **l'insuline aspartate/aspartate cristallisé**, nous pourrions dire que ces derniers ne contiendraient pas d'endotoxines bactériennes. Mais, on ne pourrait pas conclure sur l'innocuité totale de ces produits.

Un test LAL négatif indique seulement l'absence d'endotoxines et non l'absence d'autres micro-organismes pyrogènes. La réalisation de cet essai ne peut conduire qu'à la confirmation

d'un environnement exempt de pyrogènes que lorsque ce test est accompagné d'autres analyses et de mesures sanitaires spécifiques visant à éradiquer le reste des micro-organismes contaminants. [35]

3. L'évaluation de l'activité hypoglycémiante de l'insuline :

La préparation de **l'insuline aspartate/aspartate cristallisé** injectés aux souris à la dose de 0.01UI/ml a provoqué une baisse rapide de la glycémie de base au bout des deux premières heures. Avec un pic d'action au bout de deux heures ; on constate une différence entre les glycémies qui est statistiquement significative entre les 3 groupes dans cet intervalle de temps, à T1 et à T2. Puis, on observe un ralentissement de l'effet hypoglycémiant à partir de la deuxième heure jusqu'à la fin de la sixième heure (différence entre les glycémies non statistiquement significative).

Comme indiqué dans la partie « caractérisation des produits à testés », l'insuline **aspartate/aspartate cristallisée** est constituée de deux types d'analogues d'insuline : l'insuline à action rapide (**insuline aspartate**) et l'insuline à action intermédiaire (**insuline aspartate cristallisé**) ce qui donnerait deux pics d'activité maximale dans les conditions normales d'utilisation. Donc, le profil cinétique ainsi obtenu correspondrait en partie à celui attendu, car nous n'avons observé que le premier pic d'action, vu que nous avons arrêté les prélèvements au T6 = 6h et que le 2^{ème} pic apparaît à partir de ce moment-là.

Contrairement à **l'insuline aspartate/aspartate cristallisé**, la préparation de **l'insuline détemir** injectés aux souris à la dose de 0.008 UI/ml a provoqué une baisse lente mais continue de la glycémie de base toute au long des six heures.

Le **détemir** est un analogue d'insuline à action intermédiaire qui mime l'action basale de l'insuline humaine ce qui donnera une baisse de glycémie continue sans donner un pic d'activité. Le profil cinétique obtenu ne présente aucun pic hypoglycémique ce qui correspondrait à celui attendu, même si nous avons eu une différence significative des glycémies des 3 lots à T2 et T4, ceci est dû à l'insuline **aspartate/aspartate cristallisée**

Le test d'ANOVA qui est l'un des tests les plus puissants en analyse statistique, nous a permis de confirmer que notre **insuline détemir** et **l'insuline aspartate/aspartate cristallisé** avait une activité hypoglycémiante différente par rapport au témoin.

L'erreur type nous a permis de constater que si on avait utilisé un plus grand nombre de souris, nos résultats obtenus seraient plus précis et plus proches des résultats réels.

Depuis les premiers jours où l'insuline est utilisée comme thérapeutique, l'activité de l'insuline a été évaluée par des essais biologiques basés sur des animaux mesurant le potentiel hypoglycémique de l'hormone. Plusieurs procédures in vivo standardisée existent où l'utilisation des souris, rats ou lapins différée selon les pharmacopées internationales. [34]

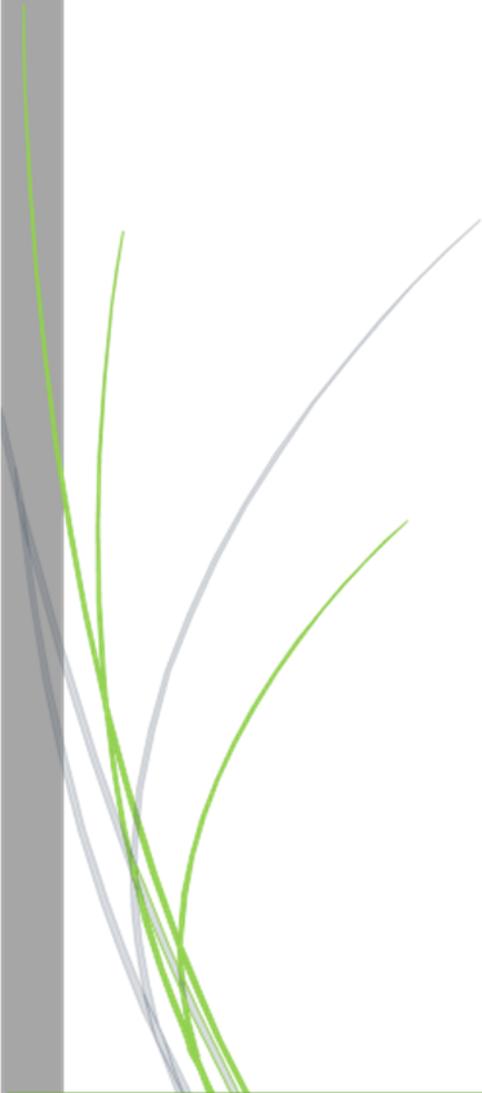
En plus d'utiliser les animaux, ces tests in vivo sont caractérisés par une variation statistique importante, ce qui rend souvent la répétition nécessaire.

Depuis l'avènement des méthodes analytiques et la découverte de la chromatographie liquide à haute performance, plusieurs pharmacopées internationales tendent à remplacer l'expérimentation sur les animaux par le dosage analytique de l'insuline qui présente l'avantage d'être plus précis, plus robuste, plus précise et plus exacte. En outre, il fournit une détermination sensible et quantitative de l'activité de l'insuline humaine ou des analogues de l'insuline. [36]

Les essais biologiques in vitro sont entre autre, une alternative à l'expérimentation animale ou plusieurs méthodes ont été proposer. [36]



CONCLUSION GENERALE ET
RECOMMANDATION



CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATION :

L'industrie de la biotechnologie a connu une croissance rapide ces dernières années, doublant sa taille entre 2004 et 2014, et donnant ainsi naissance à des produits qui ont le potentiel de générer d'énormes opportunités pour la société, ceci en améliorant la qualité des soins de santé, ce qui a permis de développer des thérapies innovantes pour des maladies jusque-là étaient considérées comme incurables. L'avènement de l'insuline et de ses analogues a permis de réaliser une percée majeure dans le traitement du diabète insulino-dépendant qui, de nos jours représente un vrai fléau où plus de 425 millions de diabétiques sont recensés dans le monde.

Notre étude s'est intéressée à deux volets importants du contrôle de qualité des médicaments à savoir le contrôle pharmacologique et le contrôle toxicologique. Deux analogues de l'insuline ont été choisis à cet effet ; l'insuline NOVOMIX et l'insuline LEVEMIR.

Pour cela, nous avons eu l'occasion de travailler avec l'équipe du LNCPP qui chaque jour, veille à assurer la qualité, l'efficacité et la sécurité des produits pharmaceutiques.

Ce travail nous a permis de connaître le rôle important des laboratoires de contrôle dans la qualité des soins fournis ainsi que la place importante, mais tout aussi intéressante et prometteuse des médicaments biologiques dans la promotion de la santé.

Sur le plan réglementaire, les biomédicaments présentent une plus grande exigence en terme de sécurité, de qualité et d'efficacité par rapport aux médicaments d'origine chimique.

Sur le plan toxicologique, l'essai de toxicité anormale nous a permis de conclure à l'absence d'une toxicité surajoutée de nos produits testés. Ce test, malgré son importance et sa large utilisation depuis des décennies, fait maintenant partie de l'un des tests les plus controversés dans le domaine de la recherche toxicologique où plusieurs autorités réglementaires notamment la FDA ont supprimés ce test de leurs recommandations.

Les résultats obtenus de la recherche d'endotoxines bactériennes par LAL test méthode de formation de gel indiquent que nos insulines testées ne contiendraient pas d'endotoxines bactériennes mais ne nous permet pas de conclure à l'absence totale d'endotoxines bactériennes.

Le LAL test fait partie des méthodes alternatives à l'expérimentation animale, il a ainsi permis de supprimer complètement le test des pyrogènes sur les lapins qui été considéré comme un test contraignant pour les animaux.

Malgré sa très bonne spécificité et sa sensibilité, le LAL test permet uniquement la recherche d'endotoxines bactériennes et ne pourrait pas être utilisé pour la recherche d'autres agents pyrogènes.

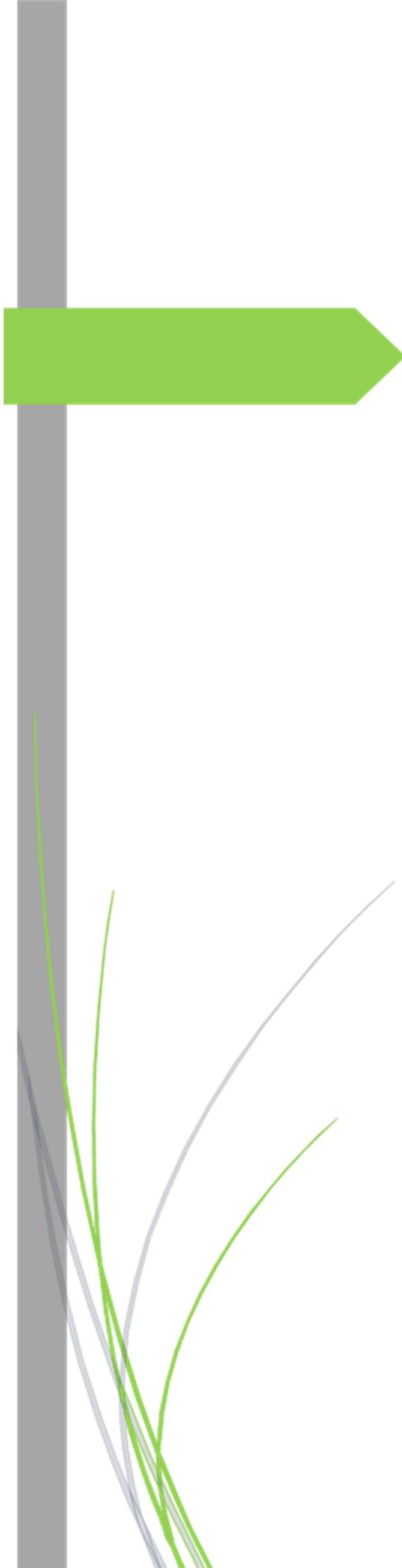
Sur le plan pharmacologique, nos insulines testées à savoir, l'insuline détemir et l'insuline aspartate/aspartate cristallisée, ont provoqué une diminution significative des taux de glycémies au cour du temps chez les souris par rapport au témoin et cela en présentant un profil cinétique propre à chaque types d'insuline. En effet, l'insuline aspartate/aspartate cristallisée a présenté deux pics d'activité hypoglycémique tandis que l'insuline détemir n'a présenté aucun pic d'activité hypoglycémique.

Les autorités compétentes tendent à remplacer l'expérimentation animale par des méthodes dites alternatives plus pertinentes et plus pratique notamment pour les biomédicaments de par les exigences qu'ils doivent respectés tant sur le profil efficacité que sur le profil sécurité et qualité.

Le secteur de la biotechnologie est très innovant et est sur une forte trajectoire de croissance. Avec son immense potentiel de croissance, il continuera de jouer un rôle important en tant que centre industriel innovateur. Il est l'un des secteurs les plus importants pour améliorer le profil mondial d'un pays et contribuer à la croissance de l'économie.

L'Algérie ambitionne de devenir le quatrième pôle biotechnologique dans le monde à l'horizon 2020. Pour ce faire, quatorze grands laboratoires, dont Pfizer, Merck, Abbott, Eli Lilly, MSD, Johnson & Johnson, Novartis, Roche, Bayer et GSK, sont mis à contribution pour réussir ce pari. [35]

Si le pays offre de nombreux avantages comparatifs en termes d'installations de recherche et développement, de connaissances, de compétences et de rentabilité, l'industrie de la biotechnologie en Algérie a un immense potentiel pour devenir un acteur clé mondial.



ANNEXES

Annexe I

Organismes procaryotes

Hôte producteur	Avantages	Inconvénients	Exemples
Bactéries (<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus</i> , ...)	Génétique maîtrisée Possibilité de sécrétion Faible coût de production Haut rendement Simplicité des conditions de culture	Pas de modifications post-traductionnelles Production de protéines simples Production sous forme de corps d'inclusion Présence d'endotoxines	Insuline Somatostatine Hormone de croissance

Organismes eucaryotes

Hôte producteur	Avantages	Inconvénients	Exemples
Levures/ Champignons (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia pastoris</i> , <i>Aspergillus niger</i> ...)	Génétique maîtrisée Faible coût de production Haut rendement Simplicité des conditions de culture Pas d'endotoxines Présence de modifications post-traductionnelles simples	Glycoprotéines simples Glycosylation incorrecte Mauvaise sécrétion	Antigène de surface de l'hépatite B Insuline GM-CSF Hirudine
Cellules de mammifère (cellules d'ovaires d'hamster chinois, cellules de myélome murin, cellules humaines, ...)	Maturation proche de la protéine native Synthèse de protéines complexes	Culture cellulaire difficile Haut coût de production Cellules modifiées instables Faible rendement	Nombreux anticorps monoclonaux EPO tPA
Cellules d'insecte (<i>Spodoptera frugiperda</i> , ...)	Rendement élevé Présence de modifications post-traductionnelles Culture cellulaire plus facile Virus non contaminant	Manque d'information sur certains mécanismes (glycosylation) Non utilisé à l'échelle industrielle	Vaccins
Animaux transgéniques	Facilité de recueil des protéines (lait, urine,...) Synthèse de protéines complexes	Génération des individus producteurs longue Haut coût de production Non utilisé à l'échelle industrielle	Anticoagulants Hormone de croissance
Plantes transgéniques	Synthèse de protéines complexes Virus non contaminant Culture simple Faible coût de production	Contaminants de type pesticide, herbicide, ... Non utilisé à l'échelle industrielle	Avidine β -glucuronidase Anticorps monoclonaux

Annexe II

Résultats du lot témoin						
Souris	Poids(g)	T0	T1	T2	T4	T6
1	20	1,55	1,16	1,1	1,02	1,2
2	19.6	1,45	1,25	1,1	0,7	0,95
3	18.6	1,48	1,55	1,36	1,52	1,48
4	18.3	1,55	1,45	1,16	1,3	0,65
5	18.6	1,54	1,73	1,58	1,38	1,12
6	18	1,54	1,5	1,21	1,45	1,17

Résultats pour le NOVOMIX						
Souris	Poids(g)	T0	T1	T2	T4	T6
1	22.6	1,5	1,2	0,5	1,23	1
2	21.3	1,16	1	0,5	1,11	0,9
3	22.3	1,2	1	0,7	1,06	0,83
4	22.4	1,45	0,92	0,2	0,85	1,2
5	22	1,26	0,65	0,61	1,2	0,94
6	22.3	1,6	1,2	1	1,5	1,23

Résultats du lot LEVEMIR.

Souris	Poids	T0	T1	T2	T4	T6
1	21.8	1,4	1,23	1	0,8	0,9
2	21	1,51	1,44	1	0,79	0,86
3	21	1,33	0,9	0,8	1,1	0,98
4	20.9	1,33	1	0,98	0,96	0,65
5	22	1,42	1,39	1,17	0,9	0,95
6	23	1,45	1,38	1,2	0,9	0,84

Annexe III

Analyse de variance: un facteur **T0**

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
LEVEMIR	6	8,44	1,40666667	0,00490667
NOVOMIX	6	8,17	1,36166667	0,03217667
TEMOIN	6	9,11	1,51833333	0,00181667

ANALYSE DE VARIANCE

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	0,07807778	2	0,03903889	3,01071123	0,07956438	3,68232034
A l'intérieur des groupes	0,1945	15	0,01296667			
Total	0,27257778	17				

Analyse de variance: un facteur **T1**

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
LEVEMIR	6	7,34	1,22333333	0,05074667
NOVOMIX	6	5,97	0,995	0,04175
TEMOIN	6	8,64	1,44	0,04288

ANALYSE DE VARIANCE

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	0,59421111	2	0,29710556	6,58397557	0,00886176	3,68232034
A l'intérieur des groupes	0,67688333	15	0,04512556			
Total	1,27109444	17				

Analyse de variance: un facteur **T2**

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
LEVEMIR	6	6,15	1,025	0,02111

NOVOMIX	6	3,51	0,585	0,06975
TEMOIN	6	7,51	1,25166667	0,03513667

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	1,37884444	2	0,68942222	16,4152491	0,00016707	3,68232034
A l'intérieur des groupes	0,62998333	15	0,04199889			
Total	2,00882778	17				

Analyse de variance: un facteur **T4**

RAPPORT DÉTAILLÉ

Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance
LEVEMIR	6	5,45	0,90833333	0,01305667
NOVOMIX	6	6,95	1,15833333	0,04613667
TEMOIN	6	7,37	1,22833333	0,09697667

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,3396	2	0,1698	3,26183006	0,06665205	3,68232034
A l'intérieur des groupes	0,78085	15	0,05205667			
Total	1,12045	17				

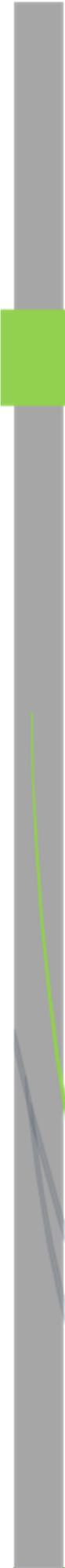
Analyse de variance: un facteur **T6**

RAPPORT DÉTAILLÉ

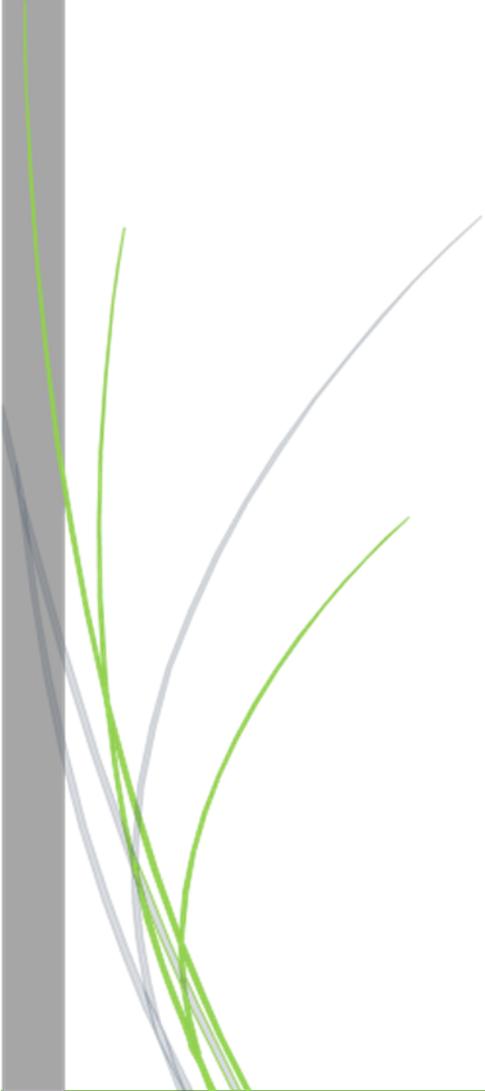
Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance
LEVEMIR	6	5,18	0,86333333	0,01370667
NOVOMIX	6	6,1	1,01666667	0,02674667
TEMOIN	6	6,57	1,095	0,07691

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,16663333	2	0,08331667	2,12971115	0,15341224	3,68232034
A l'intérieur des groupes	0,58681667	15	0,03912111			
Total	0,75345	17				



REFERENCE



REFERENCES

- [1] Raunakms. The Importance of Biotechnology in Today's Time. June 4, 2010. Disponible sur <https://raunakms.wordpress.com/2010/06/04/the-importance-of-biotechnology-in-todays-time/>
- Ralf Otto, Alberto Santagostino, and Ulf Schrader. Rapid growth in biopharma: Challenges and opportunities. December 2014. Disponible sur
- [2] <https://www.mckinsey.com/industries/pharmaceuticals-and-medical-products/our-insights/rapid-growth-in-biopharma>
- [3] <https://www.huffpostmaghreb.com/entry/le-diabete-enjeu-sanitaire-planetaire-et-affaire-de-gros-sous>.
- Ashish Swarup Verma, Shishir Agrahari, Shruti Rastogi, and Anchal Singh. Biotechnology in the Realm of History. 2011 Jul-Sep. Disponible sur
- [4] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3178936/>
- James Swarbrick.. Encyclopedia of pharmaceutical technology Third Edition
- [5] volume1P258-278
- [6] Ashutosh Kar Pharmacognosy and Pharmabiotechnology (revised expanded edition) P 41-82
- [7] U.S. Food and Drug Administration (FDA 101: Regulating Biological Products)
- [8] Faculté de médecine de Toulouse consulté en juillet 2015. Disponible sur <http://www.medecine.ups-tlse.fr/dcem1/histologie/pancreas%20endocrine%20D1.pdf>).
- [9] Deneff, J.F. Les glandes endocrines. [UCL Faculté de médecine] 1996. disponible sur (<http://www.isto.ucl.ac.be/safe/endo3.htm>)
- [10] Insulin synthesis, secretion and degradation. [Diapedia] 13 août 2014. Disponible sur (<http://www.diapedia.org/metabolism/insulin-synthesis-secretion-and-degradation>)
- [11] Goodman & Gilman's The Pharmacologic Basis of Therapeutics - 11th Ed. (2006) : chapter 60. insulin, oral hypoglycemic agents, and the pharmacology of the endocrine pancreas
-

- [12] <https://www.diapedia.org/metabolism-insulin-and-other-hormones/51040851315/insulin-synthesis-secretion-and-degradation>)
- [13] http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/pancreas/insulin_phys.html)
- [14] Hôpitaux universitaires Genève ; Informations sur les médicaments - Recommandations d'utilisation
- [15] The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group. Early worsening of diabetic retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. Arch Ophthalmol 1998;116:874-886. (level 1+)
- [16] United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: United Kingdom Prospective Diabetes Study 24: a 6-year, randomized, controlled trial comparing sulfonylurea, insulin, and metformin therapy in patients with newly diagnosed type 2 diabetes that could not be controlled with diet therapy. Ann Intern Med 1998;128:165-175. (level 1)
- [17] <http://www.hegp.fr/diabeto/traitementinsulineshema.html>
- [18] Insulin History, Biochemistry, Physiology and Pharmacology Shashank R. Joshi*, Rakesh M. Parikh**, A. K. Das***)
- [19] Krishnasalini Gunanathan : Synthetic Insulin – R&D and Industrial level Manufacturing process & requirement
- [20] <http://www.madehow.com/Volume-7/Insulin.html>
- [21] les insulines - Pharmacie des HUG
(<https://pharmacie.hugge.ch/infomedic/utilismedic/insulines>)
- [22] J -L. Prugnaud, J-H. Trouvin, Les biosimilaires, Springer, 2011
- [23] ARNAUD AGIN, dosage des analogues de l'insuline humaine :évaluation analytique et application à l'étude de biotransformation de la glargine
-

- [24] Pharmacopée Européenne, Produits obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant, 2008
 - [25] World Health Organization, Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology, 2013
 - [26] ICH, ICH Topic Q 5 D Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products, 1998
 - [27] Production, contrôle de la qualité et réglementation des médicaments biosimilaires : un challenge pour l'industrie pharmaceutique
 - [28] pharmacopée européenne 5ème édition 2005
 - [29] ICH
 - [30] Biosimilaires-Expériences cliniques en rhumatologie_CHU St Etienne
 - [31] <https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/Biosimilars/>
 - [32] European generic medicines association : biosimilar handbook
 - [33] www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Leaflet/2017/05/WC500226648.pdf
 - [34] Suppression de l'essai de toxicité anormale dans la Pharmacopée Européenne | EDQM - Direction européenne de la qualité du médicament
 - [35] <https://www.wakopyrostar.com/blog/post/part-1-the-detection-of-endotoxins-via-the-lal-test-the-gel-clot-method>
 - [36] A proposed in vitro insulin cell-based bioassay to be included in USP general chapter insulin assays
-