

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ferhat Abbas Sétif-1**



**Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département de Biochimie**

Techniques de Contrôle et *Processus* de Fabrication d'un Biomédicament

(Polycopié de Cours)

Ce Cours est destiné aux étudiants de 01^{ère} année Master

Spécialité

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Préparé par Dr. TADRENT Wafa

Maître de Conférences -B-

wafa.tadrent@univ-setif.dz

2022-2023

Table des matières

Introduction

Chapitre 1 : Processus de Fabrication d'un Biomédicament

| | |
|---|----|
| 1. Préparation des médicaments allopathiques « chimiques »..... | 3 |
| 1.1. La conception du médicament chimique..... | 3 |
| 1.2. La production du médicament chimique..... | 4 |
| 2. Processus de fabrication des médicaments biologiques..... | 5 |
| 2.1. Production des biomedicaments..... | 6 |
| 2.1.1. Les lignées cellulaires..... | 7 |
| 2.1.2. Constitution des banques cellulaires | 9 |
| 2.1.3. Upstream Processing..... | 9 |
| 2.1.3.1. Expansion cellulaire..... | 9 |
| 2.1.3.2. La Récolte..... | 9 |
| 2.1.4. Downstream Processing | 10 |
| 2.2. Mise en forme pharmaceutique..... | 11 |
| 2.3. Conditionnement pharmaceutique et contrôles..... | 11 |
| 3. Les usages des biomédicaments..... | 12 |
| 3.1. Les biomédicaments substitutifs..... | 12 |
| 3.2. Les biomédicaments modificatifs..... | 12 |
| Exercice..... | 13 |

Chapitre 2 : Techniques Contrôle du Processus de Fabrication d'un Biomédicament

| | |
|--|----|
| I. Stratégie de contrôle microbiologique des préparations..... | 15 |
| A. Contrôle de propreté..... | 17 |
| 1. Echantillonnage..... | 17 |
| 2. Méthodes d'analyse..... | 18 |
| 3. Contrôle microbiologique en cours de production (In Process Control)..... | 21 |
| 1. Filtration sur membrane..... | 21 |
| 2. Dénombrement sur plaques..... | 23 |
| a. Ensemencement en profondeur..... | 23 |
| b. Etalement en surface..... | 23 |
| c. Méthode du nombre le plus probable..... | 23 |
| 3. Recherche des germes spécifiés..... | 24 |
| 1. Recherche des entérobactéries..... | 24 |
| 2. Recherche d' <i>E.coli</i> | 24 |
| 3. Recherche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 25 |
| 4. Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> | 25 |
| 5. Recherche des <i>Salmonelles</i> | 25 |
| B. Contrôle de stérilité..... | 26 |
| 1. Echantillonnage..... | 27 |
| 2. Ensemencement..... | 27 |

| | |
|--|----|
| 3. Expression des résultats..... | 28 |
| 4. Interprétations et les critères de validation..... | 28 |
| 5. Critères de conformité et de retest..... | 28 |
| II. Techniques de contrôle toxicologique des préparations..... | 29 |
| A. La toxicité anormale..... | 29 |
| B. Les pyrogènes..... | 31 |
| 1. Test du lapin..... | 31 |
| 1.1. Technique..... | 32 |
| 1.2. Essai préliminaire..... | 32 |
| 1.3. Essai définitif..... | 32 |
| 2. LAL Test..... | 33 |
| 2.1. Le test <i>in vitro</i> | 34 |
| 2.2. Les différentes méthodes..... | 35 |
| 2.2.1. Méthode par gélication..... | 35 |
| 2.2.2. Méthode de turbidimétrie..... | 35 |
| 2.2.3. Méthode chromogénique..... | 36 |
| III. Contrôle physico-chimique des préparations..... | 37 |
| Exercice..... | 42 |

Chapitre 3 : Techniques d'immuno-marquages et d'immuno-détections

| | |
|-------------------------------------|----|
| 1. Définition..... | 44 |
| 2. Types de marquages..... | 44 |
| 3. Détection par marquage..... | 44 |
| 4. Méthodes de dosages..... | 45 |
| I. Immuno-enzymologie..... | 46 |
| II. Immunofluorescence..... | 47 |
| III. Cytométrie de flux (FACS)..... | 48 |
| IV. Radio-immunologie..... | 48 |
| V. Immunoblot..... | 49 |
| Exercice..... | 50 |

Introduction

La difficulté à traiter certaines maladies, en cancérologie et hématologie essentiellement, appelle à chercher de nouveaux traitements. Pour ces pathologies, les médicaments biologiques ont offert des améliorations du Service Médical Rendu souvent majeures.

Le biomédicament répond à la définition du médicament mais il possède cependant quelques particularités supplémentaires comme son immunogénicité. Cela peut induire des différences au niveau du produit final (d'activité ou de stabilité).

Nous allons, dans un premier temps, distinguer à l'aide du Code de la Santé Publique, qu'un médicament chimique définit comme « *toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques* » selon l'article L.5111-1 du Code de la Santé Publique.

Pour illustrer cette définition on peut donner l'exemple de l'acide acétylsalicylique, plus connu sous le nom Aspirine et utilisé pour ses propriétés antipyrétiques, analgésiques, antiagrégantes plaquettaires et, à forte dose, anti-inflammatoires.

Alors que le médicament biologique est défini « *On entend par médicament biologique, tout médicament dont la substance active est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physiques, chimiques et biologiques ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle.* » selon l'article L.5121-1 du Code de la Santé Publique.

Le biomédicament se définit à travers trois grands critères: la source biologique de la molécule active, les biotechnologies qui définissent son procédé d'obtention et son immunogénicité. La substance biologique obtenue est un mélange d'isoformes complexes qui peuvent induire des réponses différentes (positives ou négatives) chez l'individu.

C'est en 1984, que le premier médicament biologique, une insuline recombinante, arrive sur le marché français. Depuis cette date, les biomédicaments représentent une part sans cesse croissante des nouvelles voies thérapeutiques, le marché des biomédicaments suit une évolution exponentielle.

Chapitre 1

Processus de Fabrication d'un Biomédicament

Avant de préciser les modes de production des biomédicaments, nous allons rappeler brièvement la fabrication des médicaments allopathiques qualifiés de « chimiques », cela nous permettra d'avoir un point de comparaison pour évoquer les différences et les points communs avec le médicament biologique et de dresser certaines conclusions.

1. Préparation des médicaments allopathiques « chimiques »

Aujourd'hui, l'industrie pharmaceutique a pris le relais sur la fabrication à faible échelle, car les principes actifs des médicaments, leur structure moléculaire et leur synthèse sont clairement identifiés et dominés. Dans la vie d'un médicament chimique, il y a deux « périodes clés » : la conception et la fabrication (figure 1).

1.1. La conception du médicament chimique

La conception d'un nouveau médicament chimique aboutit à la réalisation d'un prototype qui sera soumis à divers contrôles, essais précliniques et essais de productions semi-industrielles, puis essais cliniques, qui ont notamment pour rôle de préciser les indications thérapeutiques. Une fois cette étape validée une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) peut être obtenue et l'étape de la fabrication industrielle est alors lancée.

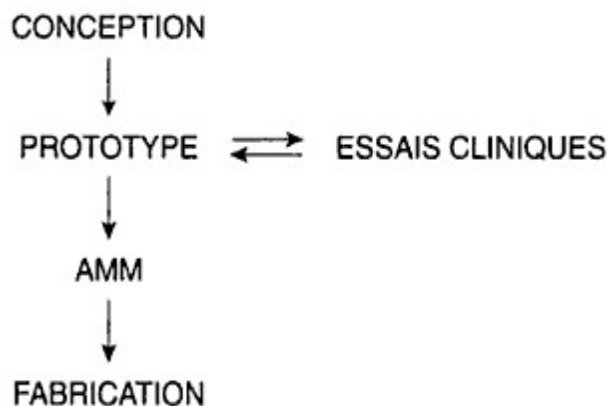


Figure 1. Les étapes de fabrication d'un médicament

Lors de la conception du prototype, il faut parfaitement maîtriser le principe actif : ses propriétés physicochimiques (solubilité, stabilité et incompatibilité) et son devenir dans l'organisme (pharmacocinétique, activité thérapeutique et biodisponibilités).

Les propriétés connues du principe actif vont donner lieu au choix de la voie administration, de la forme galénique, des excipients, du conditionnement, du procédé de fabrication industrielle et du contrôle du nouveau médicament (figure 2).

| | |
|---|--|
| <p><i>Propriétés physico-chimique</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Caractères organoleptiques - Propriétés physiques : Solubilité - Propriétés chimiques : <p style="text-align: center;">Stabilité et incompatibilité</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="font-size: 3em; margin-right: 10px;">}</div> <ul style="list-style-type: none"> - Température - Humidité - Oxygène - Lumière - Divers </div> | <p><i>Devenir dans l'organisme</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Pharmacocinétique : <ul style="list-style-type: none"> • Répartition • Biotransformations • Élimination - Activité thérapeutique <ul style="list-style-type: none"> • Lieu • Mécanisme • Effets secondaires - Biodisponibilités : <ul style="list-style-type: none"> • Profil optimal |
|---|--|

Figure 2. Propriétés du principe actif a connaitre pour sa fabrication.

La conception d'un prototype fait appel à deux modes de synthèse :

- La Synthèse chimique : synthèse complète selon la formule chimique brute du principe actif.
- L'Hémisynthèse: synthèse à partir d'une molécule naturelle qui sera modifiée pour donner un nouveau principe actif.

1.2. La production du médicament chimique

Après l'obtention de l'AMM, il est nécessaire de produire le médicament à grande échelle. Le développement de la branche pharmaceutique avec l'apparition d'un secteur industriel et son perfectionnement au niveau de l'extraction de la substance active et de sa synthèse au cours du XXe siècle, ont permis d'automatiser progressivement les procédés de fabrication du médicament et donc sa production a grande échelle. Les deux modes de synthèse de médicaments : synthèse chimique et hémisynthèse, peuvent répondre a cette nécessité.

L'industrie pharmaceutique assure aujourd'hui la fabrication des médicaments chimiques, leurs premières expérimentations précliniques et cliniques avant la demande de mise sur le marche, leur forme pharmaceutique et leur développement a grande échelle.

2. Processus de fabrication des médicaments biologiques

Biomédicament désigne plus simplement tout médicament dont la substance active est une macromolécule thérapeutique produite par le vivant. Ces macromolécules, ni chimiques, ni vivantes, le biomédicament est en quelque sorte un intermédiaire entre le médicament chimique et le médicament vivant (figure 3).

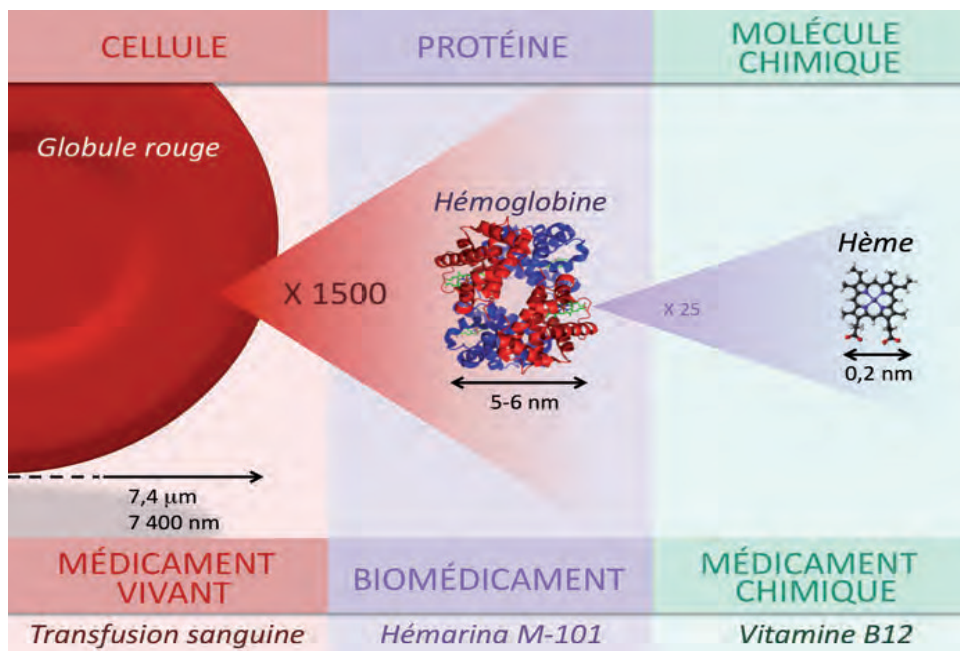


Figure 3. Exemple pratique permettant de positionner le biomédicament par rapport au médicament vivant et au médicament chimique, en référence à une situation physiologique, celle du transport sanguin de l'oxygène.

Les biotechnologies ont commencé à prendre leur essor au XX^{ème} siècle. Cependant, celles-ci ont pris un tournant considérable avec l'apparition du génie génétique notamment liée au déchiffrement du code génétique en 1964 et qui a permis d'établir les relations entre un triplet de base de l'ADN et un acide aminé. Grâce à ces études c'est l'origine des protéines qui a pu être établie. En effet, Les ARN copient l'information contenue dans l'ADN et l'apportent à la machinerie cellulaire qui grâce aux données transmises se charge de synthétiser des protéines.

Le génie génétique est un ensemble de techniques qui consiste à utiliser, reproduire ou modifier le génome des êtres vivants. Le premier transfert de gène d'un organisme à un autre a été réalisé en 1971 par Paul Berg où il introduisit le gène d'un virus de singe dans une Bactérie. C'est grâce à ce type de technique que le premier gène synthétique, l'insuline (Humulin[®], 1982), fût commercialisé et approuvé par l'autorité de santé américaine, la FDA (Food and Drug Administration). Il devient alors possible de faire fabriquer par tout type de cellules vivantes (mammifère, levure, bactérie, végétale, insectes) en culture une protéine humaine ayant un intérêt thérapeutique qui après purification sera injectée au malade. La protéine thérapeutique ainsi fabriquée est dite recombinante. De 1982 à 2013, c'est au total 91 protéines thérapeutiques recombinantes qui ont été approuvées par la FDA.

Ces approbations concernent notamment différentes classes pharmacologiques qui incluent les anticorps monoclonaux, les modulateurs enzymatiques et les modulateurs de récepteurs.

En plus des protéines thérapeutiques dont les anticorps monoclonaux représentent une grande part, cette classe de médicaments comprend également les vaccins, les produits pour thérapie génique et cellulaire, et les dérivés du sang ou du plasma humain. Les ventes des biomédicaments ont enregistré un chiffre d'affaires de 78 milliards de dollars en 2006 contre 179 milliards en 2014. Elles devraient atteindre les 250 à 300 milliards en 2020, pour représenter près d'un tiers du marché pharmaceutique mondial.

2.1. Production des biomédicaments

Les médicaments dérivés du génie génétique sont fabriqués selon les étapes présentes dans la Figure 4: La séquence codante pour la protéine désirée est insérée dans un vecteur d'expression qui sera transféré dans une cellule hôte, issue d'une lignée cellulaire définie, afin de synthétiser la dite protéine. Cette cellule hôte servira de base pour la production de banques cellulaires. Les cellules seront ensuite mises en culture dans des bioréacteurs de tailles croissantes pour accroître leur quantité avant d'être cultivée dans le bioréacteur final (jusqu'à 20m³) qui se finalisera par la récolte de la protéine désirée. Cette première phase qui correspond à la culture cellulaire est également appelé phase « Upstream ». Elle est suivie de la phase « Downstream » qui consiste à purifier la protéine. Celle-ci est ensuite formulée et conditionnée.

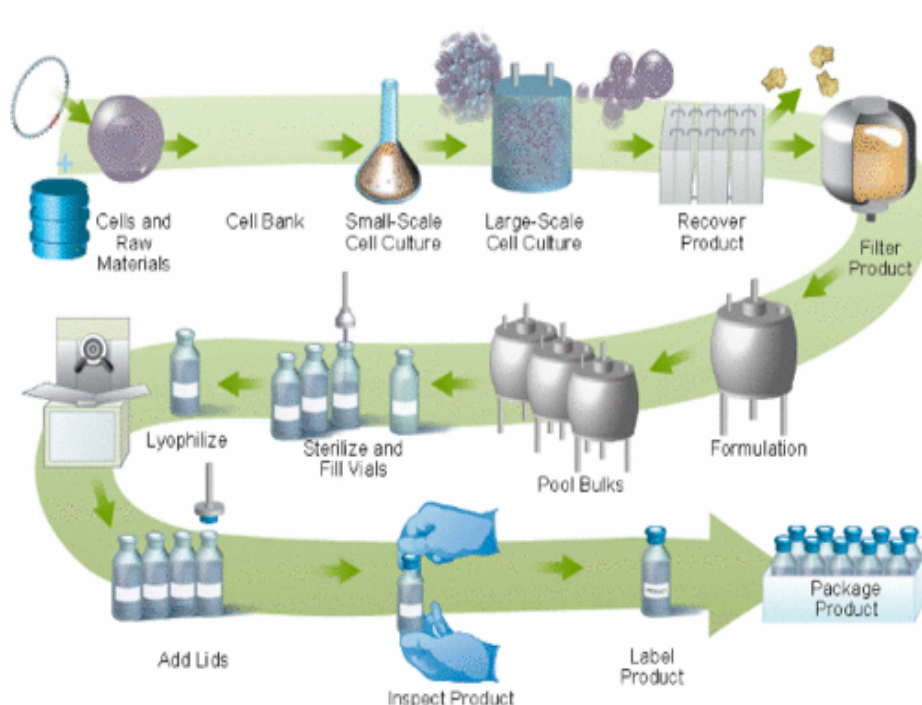


Figure 4. Etapes de la production des biomédicaments.

2.1.1. Les lignées cellulaires

Les médicaments biotechnologiques sont principalement fabriqués à partir de cellules animales en raison de leurs propriétés qui sont proches des cellules humaines et de leur machinerie qui permet la fabrication de protéines recombinantes dont la structure et la composition sont les plus proches de celles retrouvées chez les êtres humains. Cependant, d'autres systèmes hôtes tels que les cellules d'insectes, les cellules végétales, les bactéries ou encore les levures sont utilisés en fonction des besoins requis.

Les lignées cellulaires qui sont actuellement utilisées sont des lignées continues, c'est-à-dire que les cellules ont une capacité illimitée de division. On parle alors d'immortalisation. Cette caractéristique peut s'obtenir de différentes façons :

- Spontanément à partir de cellules normales ayant échappées à la sénescence
- A partir de tissus tumoraux
- A partir de cellules normales par agents chimiques, physiques et expression d'oncogènes.

L'avantage de ces cellules est qu'elles sont plus productives, s'adaptent plus facilement à leur environnement et sont moins fragiles en bioréacteur ce qui facilite leur utilisation lors des étapes de transfert industriel.

Les lignées cellulaires qui sont les plus utilisées sont répertoriées dans le tableau suivant :

| <i>Cellule</i> | <i>origine</i> | <i>Application courante</i> |
|-----------------------------|---|---|
| <i>Vero</i> | Cellules épithéliales du rein de singe vert | Vaccins viraux humains et vétérinaires |
| <i>ST</i> <i>MDCK</i> | Cellules épithéliales de testicules de porc et de rein de chien | Vaccins viraux vétérinaires |
| <i>CHO</i> | Cellules d'ovaire d'hamster chinois | Protéines recombinantes |
| <i>BHK</i> | Cellules de rein de bébé Hamster | Facteur VIII, vaccins viraux et vétérinaires |
| <i>Sf9</i> <i>High-5</i> | Cellules d'insectes | Protéines recombinantes |
| <i>HEK293</i> | Cellules épithéliales de rein humain transformées | Adénovirus |
| <i>PER.C6</i> | Cellules de rétine humaine | Protéines recombinantes |
| <i>NS0</i> <i>Sp 2/0</i> | Cellules de myélome de souris | Protéines recombinantes |
| <i>Hybridomes</i> | Cellules murines hybridées | Anticorps monoclonaux utilisés pour le diagnostic |

Tableau 1: Lignées cellulaires les plus utilisées

Dans le cadre de la production de protéines recombinantes, ce sont les cellules CHO qui sont les plus utilisées. En effet, celles-ci sont robustes, n'ont pas besoin de support pour proliférer, sont facile à transfert, ont une plus grande résistance aux infections virales, génèrent des protéines de qualité avec des profils glycosylés quasi-humains et possèdent des rendements de production pouvant aller jusqu'à 10 g/L.

Une fois la lignée cellulaire choisie, celle-ci sera modifiée génétiquement afin d'obtenir la protéine désirée. C'est la technique de l'ADN recombinant qui sera utilisée. Dans un premier temps, un gène humain qui code pour la protéine désirée est inséré dans un plasmide ou encore appelé vecteur d'expression. Il est ensuite transféré dans une cellule hôte qui aura la capacité d'exprimer la dite protéine. Une opération de sélection est ensuite menée. En effet, le plasmide utilisé contient à l'origine un gène de résistance à un antibiotique (si utilisation d'une bactérie comme cellule hôte). En conséquence, seules les cellules qui auront intégré le plasmide pourront survivre lorsqu'elles seront mises en contact avec l'antibiotique concerné. Le transfert d'un plasmide dans une cellule n'est pas toujours réalisé à 100%.

Les cellules ainsi que la protéine qui est synthétisée seront alors testées pour vérifier si celles-ci répondent aux critères de qualité requise pour une production à l'échelle industrielle. En fonction des résultats, un seul clone de ces cellules sera sélectionné afin de constituer des banques cellulaires qui permettront d'assurer la production du médicament biotechnologique durant toute sa durée de vie.

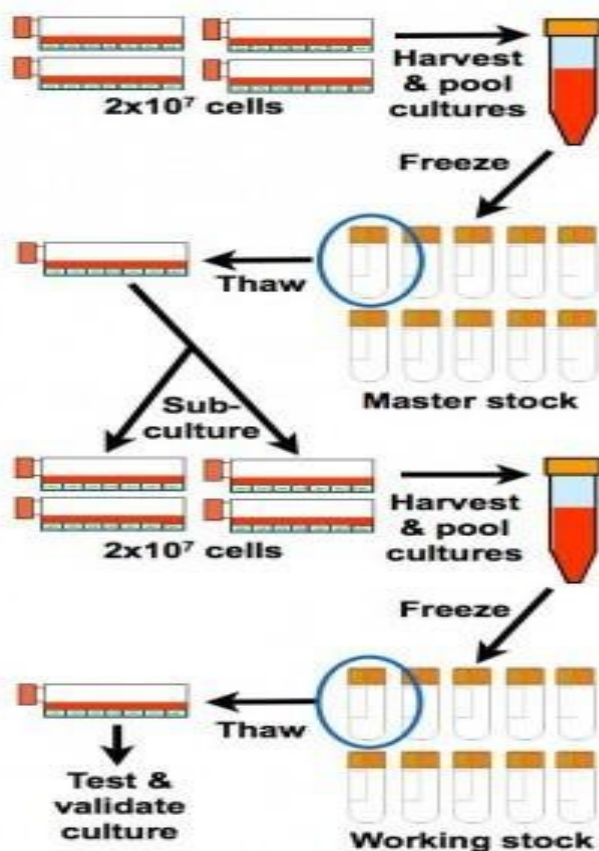


Figure 5. Méthode de constitution des banques cellulaires.

2.1.2. Constitution des banques cellulaires

Il existe deux types de banques cellulaires :

- la banque cellulaire primaire ou Master Cell Bank (MCB).
- la banque cellulaire de travail ou Working Cell Bank (WCB).

Le but de ces banques cellulaires est de fabriquer des protéines recombinantes qui seront le plus homogène entre elles puisque qu'elles découleront toutes du même clone sélectionné.

2.1.3. Upstream Processing

2.1.3.1. Expansion cellulaire

L'objectif de cette étape est de générer la quantité de cellules nécessaire à l'ensemencement du bioréacteur qui assurera la production industrielle.

Dans un premier temps, un tube de la WCB est décongelé et mis en culture dans un premier bioréacteur. Après un temps déterminé, la culture est ensuite transférée dans un bioréacteur de taille supérieure. La même opération est réalisée successivement dans des bioréacteurs de taille croissante jusqu'à atteindre la quantité cellulaire voulue. Puis, le bioréacteur final estensemencé.

Comme les cellules vivantes et notamment les cellules animales sont sensibles à leur environnement, leur milieu de culture doit être composé d'éléments nutritifs essentiels tels que les sels organiques, les acides aminés, les oligo-éléments, les vitamines, les sources de carbone, l'oxygène, les agents tampons et les lipides. Cependant, la formation d'éléments issus du métabolisme cellulaire tels que le lactate, les ions ammoniums ou le butyrate de sodium doivent tous autant être surveillés en raison de leur toxicité cellulaire et de leurs effets négatifs sur la quantité et la qualité des protéines glycosylées.

Plusieurs paramètres comme la température, le pH, la pression et l'agitation doivent également être contrôlés et pilotés pour assurer la production d'une protéine de qualité. En effet, des variations mêmes mineures du procédé peuvent avoir un impact sur l'expression des cellules ce qui peut entraîner la formation d'un produit non souhaité.

2.1.3.2. La Récolte

Une fois que le temps de culture dans le bioréacteur final est atteint, il s'ensuit l'étape de récolte ou « clarification primaire » où le produit d'intérêt est principalement séparé des cellules et de diverses impuretés.

Cependant, deux cas peuvent se présenter : soit la protéine d'intérêt reste dans le milieu intracellulaire soit elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire. Dans le premier cas, il faut d'abord récupérer toute la biomasse contenue dans le bioréacteur et éliminer le milieu de culture.

Les cellules sont ensuite lysées et la protéine se retrouve alors dans un mélange constitué de débris cellulaires et du reste du contenu intracellulaire. Dans le deuxième cas, on doit séparer le milieu de culture, qui contient la biomolécule et différentes impuretés, des cellules.

A l'issue de ces deux cas, la protéine devra être isolée à l'aide d'opérations de centrifugation et de filtration en profondeur. Une filtration tangentielle est souvent ajoutée pour concentrer le filtrat avant de passer à la phase de purification.

2.1.4. Downstream Processing

La phase « Downstream » est conçue de manière à éliminer le reste des impuretés et donc à obtenir une protéine d'une pureté maximale. Elle est essentiellement constituée d'étapes de chromatographie et de procédés de séparation membranaire. La première étape consiste généralement à capturer la protéine d'intérêt et à éliminer les impuretés en ayant recours à une chromatographie d'affinité. Dans le cas de la production d'un anticorps monoclonal, c'est la protéine A qui est utilisée comme ligand sur la phase stationnaire. Le taux de purification atteint est généralement de l'ordre de 90 %.

Les deux chromatographies qui sont ensuite le plus souvent utilisées sont les chromatographies échangeuses d'ions et d'interaction hydrophobe

La chromatographie par échange d'ions élimine les protéines indésirables, les sels, les résidus et permet d'obtenir un taux de purification pouvant aller jusqu'à 99%. Celle d'interaction hydrophobe sert à éliminer des impuretés à l'état de traces, dont des substances apparentées à la protéine d'intérêt (polymères, fragments et autres formes mal repliées).

En parallèle de ces étapes, la solution contenant le produit doit être soumise à des opérations de clairance virale (ex : inactivation virale, filtration virale). De par leur nature et leurs origines, les produits biotechnologiques sont plus facilement sujets à des contaminations virales. Il faut donc s'assurer que le procédé de fabrication élimine ce risque.

Des étapes de filtration tangentielle peuvent également être mises en place au cours du procédé. Celles-ci sont utilisées soit pour séparer des composés en fonction de leur taille ou de leur poids moléculaire, soit pour diminuer le volume d'élution (c'est ce qu'on appelle l'ultrafiltration) lorsqu'elles sont placées en amont des étapes de chromatographie soit pour changer la composition d'un solvant en ajoutant des excipients permettant la formulation du produit purifié (c'est ce qu'on appelle la diafiltration).

La phase downstream se finalise par une filtration virale et une filtration de polissage (0,2 µm de diamètre pour les pores du filtre) qui permettent d'atteindre un taux de pureté de l'ordre de 100 %.

2.2. Mise en forme pharmaceutique

La formulation est une étape complexe qui est réalisée par le fabricant de la substance active. A l'instar des molécules chimiquement synthétisées, les protéines possèdent un poids moléculaire très élevé. Une entité chimique pèse en moyenne 250 Da contre 4500 voire 260000 Da pour une protéine, ce qui est incompatible avec une absorption digestive. Aussi, leurs caractéristiques physico-chimiques, biologiques et immunologiques doivent également être conservées puisqu'elles ont un impact sur l'efficacité thérapeutique mais aussi sur la santé du patient.

De plus, les protéines présentent une instabilité physique (fragmentation, agrégation, etc.) et chimique (risque de déamination, d'oxydation, etc.). Elles ne peuvent donc pas être absorbées par voie orale puisqu'elles ne résistent pas aux attaques enzymatiques des protéases présentes dans le tractus gastro-intestinal.

Les procédés de mise en forme pharmaceutique actuels font surtout intervenir la lyophilisation car elle permet de mieux conserver le médicament et de maintenir sa stabilité. La protéine peut être directement formulée sous forme injectable (flacon, ampoule ou seringue) par ajout de sels pour ajuster le pH, d'adjuvants pour assurer sa conservation, sachant qu'il reste difficile de maintenir en solution de fortes concentrations de protéines sans risque d'agrégat.

Une fois formulées, les protéines thérapeutiques nécessitent des précautions d'emploi particulières tout au long de la chaîne de distribution : La chaîne du froid doit être respectée, elles doivent être protégées de la lumière et ne pas être brutalement agitées.

Le remplissage final est ensuite réalisé de manière aseptique afin de ne pas contaminer le produit.

2.3. Conditionnement pharmaceutique et contrôles

Les protéines recombinantes sont sensibles à leur environnement. Leur conditionnement doit garantir la stabilité et l'intégrité du médicament. Pour cela, le produit purifié doit être correctement manipulé, analysé, transporté et stable lors de la conservation. On doit également déterminer son activité et sa qualité avant de le mettre à disposition des patients.

Après avoir détaillé le *processus* de fabrication de la culture cellulaire et du transfert de gène (figure 6), on remarque que le processus est complètement différent de celui du médicament de synthèse. Il faut bien faire attention à respecter les paramètres physiques et chimiques.

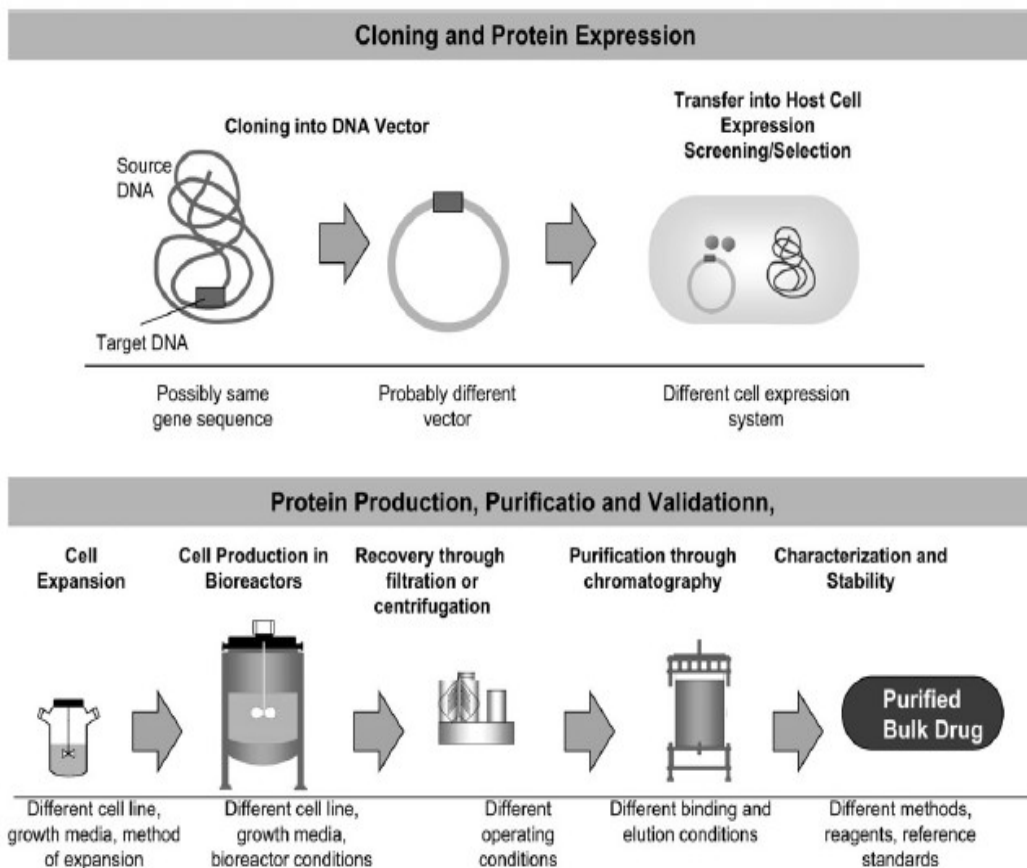


Figure 6. Production de protéines recombinantes: Source de variation entre les fabricants.

3. Les usages des biomédicaments

Couvrant un arsenal thérapeutique très large, ils sont souvent classés en fonction de leur activité thérapeutique aux:

3.1. Les biomédicaments substitutifs

Ils concourent à la correction d'insuffisances ; leur classe comporte essentiellement les vaccins, les interférons, les héparines, et les anticorps thérapeutiques. Ces derniers sont en plein essor, et représentaient déjà 17 % des 173 biomédicaments commercialisés en France en 2014. Les biomédicaments substitutifs tels que l'insuline, l'hormone de croissance (GH), l'érythropoïétine (EPO), le facteur VIII de la coagulation, et l' α -glucosidase, sont majoritairement des traitements chroniques, pouvant être administrés tout au long de la vie des patients.

3.2. Les biomédicaments modificatifs

Ils modifient la physiologie par diverses actions neutralisantes, agonistes ou antagonistes ou en déclenchant des réactions immunitaires (figure 7).

| | Biomédicaments substitutifs | Biomédicaments modificatifs | Biomédicaments commercialisés en France en 2014 (%) |
|--|--|--|---|
| Vaccins | / | Anatoxines, vaccins polysidiques, vaccin hépatite B,... | 35 |
| Hormones | Insulines, hormone de croissance,... | FSH, LH | 15 |
| Coagulation et protéines plasmatiques | α 1-antitrypsine, facteur VIII humain, ... | Héparines, streptokinase, activateurs humains du plasminogène,... | 4 |
| Facteurs de croissance | Erythropoïétine, G-CSF... | Interféron- α , interféron- β ,... | 15 |
| Enzymes | Lipase pancréatique porcine, α -glucosidase acide,... | L-asparaginase d' <i>E. coli</i> , urate oxydase,... | 8 |
| Ig, anticorps et protéines de fusion à portion Fc | Ig humaines polyvalentes, Facteur VIII-Fc | Ig humaines antitétaniques, anticorps recombinants, protéines de fusion Fc,... | 17 |

Anticorps thérapeutiques

Figure 7. Classification des biomédicaments.

Les biomédicaments révolutionnent aussi la prise en charge de nombreux malades. Acteur principal des thérapies ciblées, il s'inscrit au coeur d'une révolution médicale, orientée vers la médecine personnalisée. Désormais, le médecin ne traite plus une maladie, mais c'est tout une équipe soignante qui prend en charge un patient. De fait, l'arrivée de ces médicaments injectables a engendré un besoin d'éducation thérapeutique des patients, pour les aider à prendre en charge leur maladie et leur traitement afin d'améliorer leur qualité de vie. Les patients diabétiques par exemple, traités quotidiennement par des injections d'insuline, doivent apprendre à suivre leur glycémie en cours de journée tout en adaptant les doses d'insuline à injecter. Pour leur sécurité et leur bien-être, ces patients doivent apprendre à réagir en cas d'hypoglycémie ou d'hyperglycémie. Se développent ainsi de nouvelles approches de soin et donc de nouvelles missions pour les professionnels de santé (Figure 8).

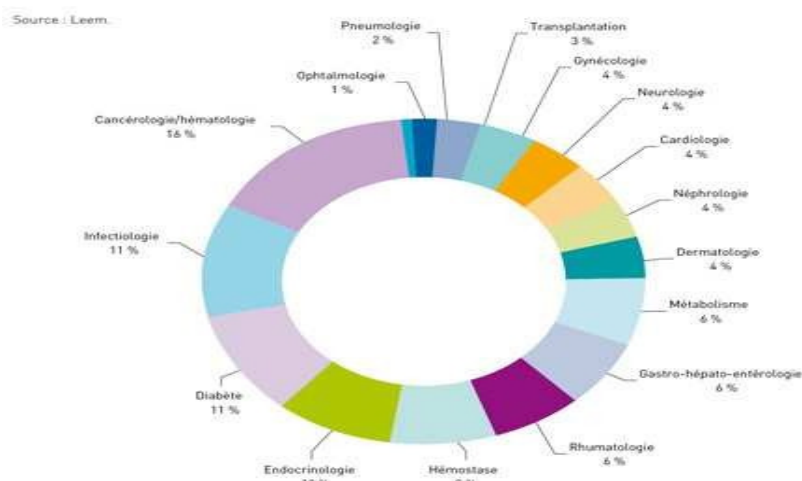


Figure 8. Les différents domaines thérapeutiques des biomédicaments.

EXERCICE :

✚ Donner une comparaison entre le médicament et le biomédicament ?

Chapitre 2

Techniques Contrôle du Processus de Fabrication d'un Biomédicament

I. Stratégie de contrôle microbiologique des préparations

La production pharmaceutique regroupe l'ensemble des opérations de transformation des matières premières en produits finis. Elle répond à des normes de qualité nationales et internationales très strictes dans le but de garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité des médicaments produits.

Dans ce cadre, les établissements fabriquant et commercialisant des produits pharmaceutiques doivent se soumettre aux **BPF** (Bonnes Pratiques de Fabrication). Ces règles sont destinées à assurer la qualité des médicaments et leur conformité aux spécifications comprises dans les dossiers d'enregistrement. Elles concernent:

- la conception et l'entretien des locaux
- la formation et l'habilitation du personnel
- les spécifications et le contrôle des matières
- la qualification des équipements et la validation des procédés de fabrication et des méthodes d'analyse

Ainsi, dans une unité de production, un département qualité est chargé de cette mission. Il regroupe les fonctions de contrôle qualité et d'assurance qualité

La qualité d'un médicament en production pharmaceutique est définie par la « Pharmaceutical Manufacturers Association (PMA) aux USA comme suit:

« La qualité des médicaments et produits apparentés est la somme de tous les facteurs qui contribuent directement ou indirectement à la sécurité, l'efficacité, l'acceptabilité du produit. »

Selon (American Pharmacists Association), la désignation « **Qualité** » appliquée à un médicament exige :

- Qu'il contienne la quantité de chaque principe actif, inscrite sur l'étiquette, dans les limites acceptables de ses spécifications
- Qu'il contienne cette quantité dans chaque dose unitaire
- Qu'il soit exempt de substance étrangère

Qu'il maintienne son dosage, sa disponibilité thérapeutique, son apparence jusqu'à utilisation

- Qu'après administration, il libère le principe actif avec une entière biodisponibilité

- Les conditions réglementaires de **validation** d'un médicament fini sont clairement décrites dans les directives BPF. Le produit doit contenir
 - ✓ la substance active en proportions qualitatives et quantitatives correspondant aux documents d'autorisation
 - ✓ présenter la pureté requise.
 - ✓ Les examens doivent être effectués selon des méthodes validées qui sont adaptées pour garantir la qualité du médicament. Les rapports des analyses **microbiologiques** ; **physicochimiques** et **toxicologiques** doivent être entièrement et clairement consignés selon les directives BPF.

Les bonnes pratiques de fabrication (BPF) constituent un des éléments de l'assurance de la qualité ; elles garantissent que les produits sont fabriqués et contrôlés de façon cohérente et selon les normes de qualité adaptées à leur emploi et requises par l'autorisation de mise sur le marché (AMM).

L'assurance qualité est l'ensemble des mesures prises pour s'assurer que les médicaments fabriqués sont de la qualité requise pour l'usage auquel ils sont destinés.

Le contrôle qualité : est le volet de gestion de la qualité qui concerne en

- l'échantillonnage
 - les spécifications
 - le contrôle
 - les procédures d'organisation, de documentation et de libération qui garantissent que les analyses nécessaires et appropriées ont réellement été effectuées et que les matières premières, les articles de conditionnement et les produits ne sont pas libérés pour l'utilisation, la vente ou **l'approvisionnement sans que leur qualité n'ait été jugée satisfaisante.**
-
- ❖ Les analyses **microbiologiques** de substances pharmaceutiques pour la fabrication de produits finis sont prescrites par les pharmacopées des différents marchés (Ph. Eur., USP, JP). Elles doivent être effectuées par un laboratoire accrédité BPF.

Pour être totalement en conformité avec les BPF, les méthodes microbiologiques doivent être validées spécifiquement par rapport au produit. Il faut effectuer trois essais indépendants sur au moins un lot. On vérifie alors les critères d'acceptation déterminés. Ceux-ci sont indiqués

dans les pharmacopées ou déterminés en fonction des spécifications du fabricant.

Les préparations pharmaceutiques peuvent être soit:

1. des préparations non obligatoirement stériles (pour lesquelles un **contrôle de propreté** est réalisé)
2. des préparations obligatoirement stériles (pour lesquelles un **contrôle de stérilité est** réalisé)

A. Contrôle de propreté

1. Echantillonnage

Le prélèvement des échantillons du produit à analyser doit être réalisé selon un plan d'échantillonnage bien défini. Sauf indication contraire:

- utiliser un (des) échantillon(s) de 10g ou 10ml de la substance ou préparation à examiner (90 ml de diluant : **tampon peptonée au chlorure de sodium pH=7**)
- prélever avec précautions.
- effectuer les prélèvements au hasard dans le produit en vrac ou les récipients dans lesquels est conditionnée la préparation.
- si nécessaire, pour obtenir la quantité requise, mélangez-le contenu d'un nombre de récipients suffisant pour former un échantillon. Selon la nature de la substance ou préparation à examiner.

Produits hydrosolubles.

- Préparer une solution ou une dilution de 10g ou 10ml du produit à examiner dans de la solution **tampon peptonée au chlorure de sodium pH=7** ou dans un autre diluant approprié. Le rapport de dilution utilisé est en général de 1/10, mais les caractéristiques du produit ou la sensibilité requise peuvent exiger l'emploi d'autre taux de dilution.
- Si l'on sait que le produit possède une activité **antimicrobienne**, un agent d'inactivation peut être ajouté au diluant.
- Si nécessaire, ajuster à environ pH 7 et préparer les dilutions au 1/10 suivantes à l'aide du même diluant.

Produits de nature non lipidiques insolubles dans l'eau

- Préparer une suspension de 10g ou 10 ml du produit à examiner dans de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH=7 ou dans un autre diluant approprié.

- La quantité du diluant utilisée est en général de 9 pour 1, mais les caractéristiques du produit peuvent exiger l'emploi de volumes plus importants. Un agent tensioactif approprié tel que du polysorbate 80 à concentration de 1g/l, peut être ajouté pour faciliter la mise en suspension des substances difficilement hydrosolubles.

Produits de nature lipidiques

- Homogénéiser 10g ou 10ml du produit à examiner avec au maximum la moitié de sa masse de polysorbate 80 ou d'un autre agent tensioactif approprié stérile, chauffé si nécessaire à une température ne dépassant pas 40°C pdt ≤ 30 mn
- Mélanger soigneusement
- Ajouter de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium PH=7 préalablement chauffée en quantité requise pour obtenir une dilution au 1/10
- Mélanger le tout en maintenant à la même température pendant le temps nécessaire à la formation d'une émulsion (pas plus de 30 min).
- Si le produit possède une activité antimicrobienne, un agent neutralisant peut être ajouté au diluant.
- Si nécessaire, ajuster à environ pH 7 et préparer les dilutions au 1/10 suivantes à l'aide du même diluant.

2. Méthodes d'analyse

Principes de la **recherche** et du **dénombrement** de germes

- ✓ Pour dénombrer des germes (total aerobic microbiobial count, TAMC) et des champignons (levures et moisissures, total yeast mould count, TYMC), on détermine le nombre d'unités formant colonies (ufc/ml ou g) sur un milieu de culture solide (agar-agar).
- ✓ S'il faut prouver la présence de microorganismes spécifiques, on utilise des milieux de culture sélectifs. Il est possible d'obtenir une évaluation au bout de 5 à 7 jours d'incubation. Les résultats quantitatifs sont comparés avec **les valeurs limites (Normes)**
- Réaliser le dénombrement ou la recherche de germes dans des conditions permettant d'éviter tout risque de contamination accidentelle du produit à examiner.
- Les précautions prises pour éviter la contamination ne doivent pas affecter les micro-organismes susceptibles d'être mis en évidence.

Si le produit à examiner possède une activité antimicrobienne, celle-ci doit être convenablement **neutralisée**. Si des neutralisants de l'activité anti

microbienne sont utilisés à cet effet, leur efficacité et leur non toxicité à l'égard des micro-organismes considérés sont démontrées

Le dénombrement des germes aérobies viables totaux ; comme prescrit dans la monographie estréalisé par:

- La méthode de filtration sur membrane **ou**
- La méthode de dénombrement sur plaque
- La méthode dite du nombre le plus probable est à réserver aux dénombrements bactériens ne pouvant être réalisés par l'une des deux précédentes méthodes.

La validation des méthodes de contrôle des produits non stériles

☐ Préparation des souches de référence

- Cultiver séparément les souches de référence dans des milieux appropriés et incubera des températures adéquates
- Utiliser un tampon peptoné au chlorure de NaCl pH 7 pour préparer des suspensionstémoins contenant environ 100 ufc/ml

| Souches disponibles | DO à 650 nm % de de turbidité | Dilution pour validation | Milieu |
|-------------------------------|--|---|---------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 55 | 10 ⁻⁶ ≈ 100ufc/ ml | TSB |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 15 | 10 ⁻⁶ ≈ 100ufc/ ml | TSB |
| <i>Escherichia coli</i> | 70 | 10 ⁻⁶ ≈ 100ufc/ ml | Mac Conkey |
| <i>Candida albicans</i> | 60 | 10 ⁻⁶ ≈ 100ufc/ ml | Sabouraud |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 65 | 10 ⁻⁶ ≈ 100ufc/ ml | TSB |
| | | | |

| microorganisme | Préparation de la souche de référence | Fertilité des milieux | | Applicabilité de la méthode de dénombrement en présence du produit | |
|-------------------------------|--|---|---|--|--|
| | | Germes aérobies totaux | Levures et moisissures | Germes aérobies totaux | Levures et moisissures |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Milieu aux peptones de caséine et de soja (TSA et TSB) 30- 35° C - 18- 24 h | Milieu aux peptones de caséine et de soja (TSA et TSB) ≤ 100 ufc 30- 35° C ≤ 3 jours | | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja / NPP et TSB ≤ 100 ufc 30- 35° C ≤ 3 jours | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Milieu aux peptones de caséine et de soja (TSA et TSB) 30- 35° C - 18- 24 h | Milieu aux peptones de caséine et de soja (TSA et TSB) ≤ 100 ufc 30- 35° C ≤ 3 jours | | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja / NPP et TSB ≤ 100 ufc 30- 35° C ≤ 3 jours | |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Milieu aux peptones de caséine et de soja (TSA et TSB) 30- 35° C - 18- 24 h | Milieu aux peptones de caséine et de soja (TSA et TSB) ≤ 100 ufc 30- 35° C ≤ 3 jours | | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja / NPP et TSB ≤ 100 ufc 30- 35° C ≤ 3 jours | |
| <i>Candida albicans</i> | Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé ou liquide 20-25° C 2-3 jours | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ≤ 100 ufc 30- 35° C ≤ 5 jours | Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé 20-25° C ≤ 5 jours | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ≤ 100 ufc 30- 35° C ≤ 5 jours NPP: non applicable | Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé 20-25° C ≤ 5 jours |
| <i>Aspergillus niger</i> | Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé ou extrosé-gélosé à la pomme de terre 20-25° C 5- 7 jours | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ≤ 100 ufc 30- 35° C ≤ 5 jours | Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé 20-25° C ≤ 5 jours | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ≤ 100 ufc 30- 35° C ≤ 5 jours NPP: non applicable | Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé 20-25° C ≤ 5 jours |

Contrôle de la stérilité

Pour contrôler la stérilité du milieu et du diluant et l'efficacité des conditions d'asepsie appliquées, utilisez la méthode avec, comme préparation à examiner, de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7.0 stérile.

Aucune croissance microbienne ne doit être constatée.

1. Contrôle de la fertilité des milieux de culture en présence et en absence du produit à examiner

L'aptitude de l'essai à permettre la détection des microorganismes en présence du produit doit être établie.

a. En l'absence du produit à examiner

- Ensemencer des échantillons des milieux de culture liquides et solides à utiliser, avec environ 100 Ufc/ml de suspension de souche de référence (séparément)
- Incuber à des températures adéquates
- Une croissance microbienne plus au moins abondante doit être observée

b. Présence du produit à examiner (neutralisation/ élimination de l'activité antimicrobienne)

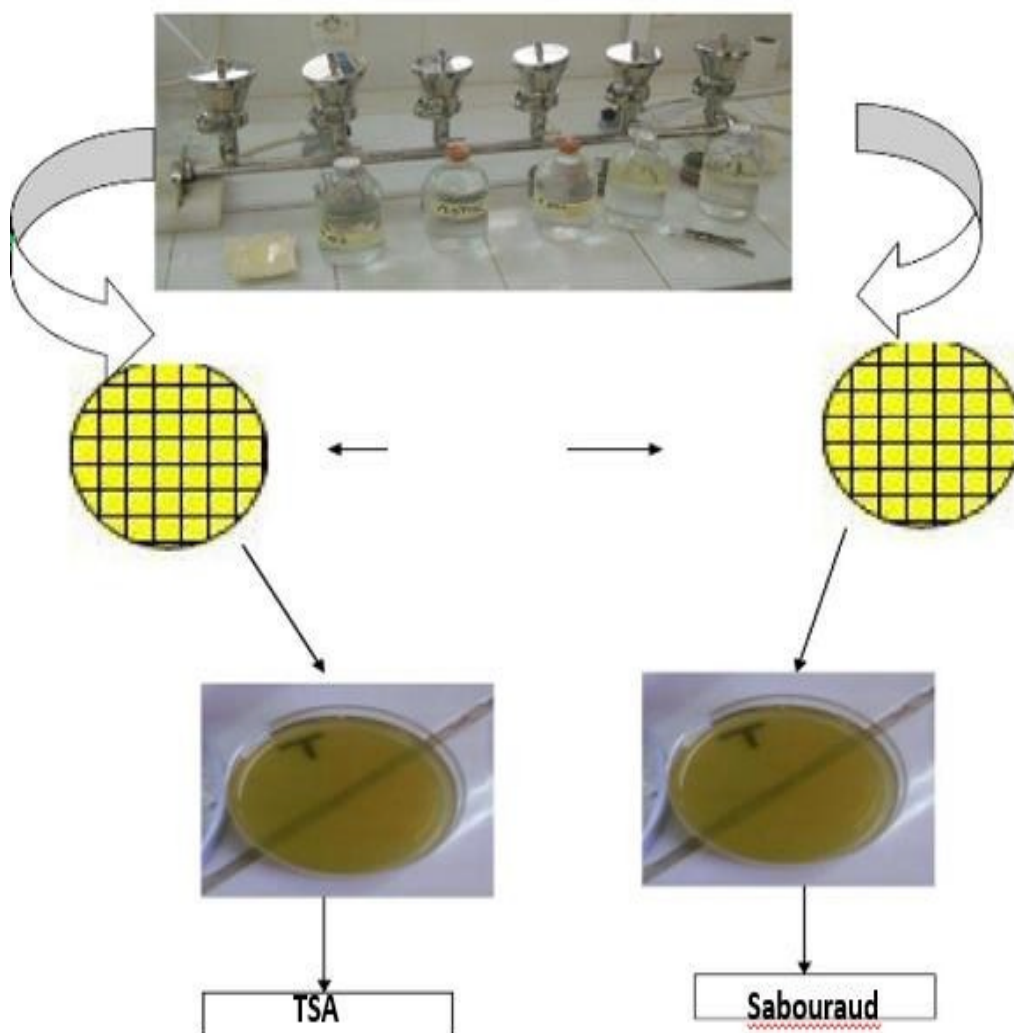
- Dans ce cas, l'échantillon à analyser est ajouté à la suspension de la souche de référence avant son ensemencement sur son milieu de culture approprié
- Comparer la croissance microbienne respectivement obtenue en l'absence et en présence de l'échantillon à examiner
- En cas d'inhibition de la croissance (réduction de plus d'un facteur 2); utiliser un agent neutralisant

3. Contrôle microbiologique en cours de production (In Process Control)

1. Filtration sur membrane

- Utiliser des membranes filtrantes ayant une porosité d'au maximum 0,45 µm (ex: en nitrate de cellulose pour les solutions aqueuses, huileuses ou faiblement alcooliques et en acétate de cellulose pour les solutions fortement alcooliques). Les filtres sont ensuite transférés sur les milieux de culture
- Introduisez dans 2 filtres à membrane une quantité appropriée de l'échantillon préparé comme décrit sous préparation des échantillons et filtrer immédiatement

- Laver chaque membrane avec environ 3 fois 100ml d'un liquide approprié, par exemple de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium PH 7,0. Cette solution peut être additionnée d'un agent tensioactif tel que le polysorbate 80 ou d'un neutralisant de l'activité antimicrobienne.
- Déposez l'une des membranes, destinée principalement au dénombrement des bactéries, à la surface d'un milieu gélosé approprié (milieu gélosé TSA par exemple) et l'autre destinée principalement au dénombrement des moisissures et levures à la surface d'un autre milieu gélosé approprié (milieu gélosé Sabouraud)
- Incubez la boîte de milieu gélosé TSA à 30-35 °C et la boîte de milieu gélosé Sabouraud à 20-25 °C pendant 5 jours, sauf si un temps d'incubation plus court permet d'obtenir un dénombrement fiable.
- Sélectionner les plaques présentant le plus grand nombre de colonies inférieur à 100, et calculez le nombre d'unité formant colonie par gramme ou par millilitre de produit



2. Dénombrement sur plaques

a. Ensemencement en profondeur:

- Introduisez dans chaque boîte de Pétri 1 ml de l'échantillon préparé et de ses dilutions, puis 15-20ml d'un milieu gélosé liquéfié adapté à la culture des bactéries ou d'un milieu gélosé liquéfié adapté à la culture des moisissures et levures (2 à 3 boîtes par dilution) à température ne dépassant pas 45 °C.
- Incubez les boîtes à 30-35°C (20-25°C pour les moisissures et levures) pendant 5 jours.
- Sélectionnez les boîtes correspondant à une dilution et présentant le plus grand nombre de colonies inférieur à 300 (100 pour les moisissures et levures). Préparez la moyenne arithmétique des dénombrements (n) et calculez le nombre d'unités formant colonies par gramme ou par millilitre de produit (N).

$$N = n \times 1/d \quad n = \text{nombre moyen} \quad d = \text{dilution considérée}$$

b. Etalement en surface

- Introduisez dans chacune des boîtes de Pétri 15-20ml d'un milieu gélosé liquéfié adapté à la culture des bactéries (milieu gélosé TSA) ou d'un milieu gélosé liquéfié adapté à la culture des moisissures et levures (milieu gélosé Sabouraud) à température ne dépassant pas 45 °C environ.
- Laissez solidifier puis faites sécher les boîtes, dans une hotte à flux laminaire ou un incubateur
- Etalez à la surface du milieu, un volume mesuré d'au moins 0.1ml de l'échantillon préparé comme décrit sous préparation des échantillons. Préparez-en au moins 2 boîtes de Pétri par milieu et par dilution. Procédez à l'incubation et au calcul du nombre d'unités formant colonies comme décrit pour l'ensemencement en profondeur.

$$N = n \times 1/d \times 1/v$$

c. Méthode du nombre le plus probable

- Préparez une série d'au moins 3 dilutions au 1/10 successives du produit comme décrit sous préparation des échantillons. Prélevez 3 fois 1 ml de chaque dilution et transférez dans 3 tubes contenant chacun 9-10 ml d'un milieu liquide approprié (milieu liquide TSA par), si nécessaire additionné d'un agent tensioactif tel que le polysorbate 80 ou d'un neutralisant de l'activité antimicrobienne (**Pour une série de 3 dilutions, il faut par conséquent ensemer 9 tubes**).
- Incubez tous les tubes à 30-35 °C pendant 5 jours. Pour chaque

dilution, notez le nombre de tube présentant une croissance microbienne

3. Recherche des germes spécifiés.

1. Recherche des entérobactéries

- Préparer l'échantillon dans le milieu liquide lactosé et homogénéiser
- Incuber à 37°C pendant 2 heures
- Agiter puis prélever 1 ml et l'introduire dans 100 ml du milieu d'enrichissement pour entérobactéries (milieu Mossel)
- Incuber à 37°C pendant 24 heures

Lecture

- Absence de trouble dans le milieu Mossel donc (absence d'entérobactéries)
- Présence de trouble :
- Ensemencer en stries un milieu gélosé (VRBG= Violet- Red- Bile- Glucose) puis incubé à 37°C pendant 24 heures
- ✓ Apparition de colonies rouges donc présence de contamination d'où la nécessité → d'identification
Produit non-satisfaisant : refaire l'essai
- ✓ Absence de colonies sur VRBG → absence d'entérobactéries

2. Recherche d'*E.coli*

- L'échantillon est préparé dans l'eau peptonée tamponnée au NaCl
- 100ml du milieu TSB sont ensemencés avec 10ml de l'échantillon préparé
- Incuber à 37°C pendant 18 à 48 heures
- Agiter puis transférer 1ml dans 100ml du milieu Mac Conkey liquide
- Incuber à 43°C pendant 24 heures

Lecture

Absence de trouble dans le milieu Mac Conkey donc absence d'*E.coli* produit satisfaisant

Présence de trouble :

- Effectuer un ensemencement sur la gélose Mac Conkey
- Incuber à 37 °C pendant 18 à 72 heures
- ✓ Apparition de colonies rouges non mucoïdes donc présence de contamination

Faire une coloration de Gram: si bâtonnets Gram négatif : faire l'identification ; si présence

E.coli donc le produit est non-satisfaisant : refaire l'essai

- ✓ Absence de colonies rouges non mucoïdes donc absence d'*E.coli* d'où le

produit est conforme

3. Recherche de *Pseudomonas aeruginosa*

- L'échantillon est préparé dans l'eau peptonée tamponnée au NaCl
- Ensemencer 100 ml du milieu liquide TSB avec 10 ml de l'échantillon préparé
- Incuber à 37°C pendant 24 heures
- Ensemencer la gélose sélective Cétrimide
- Incuber à 37°C pendant 24 heures

Lecture

Absence de colonies donc absence de *Pseudomonas aeruginosa*

Présence de colonies en forme de bâtonnets à Gram négatif :

- Ensemencer le milieu TSB avec des colonies morphologiquement différentes et incubé à 43°C pendant 24 heures
 - ✓ Si absence de trouble, donc absence de *pseudomonas aeruginosa*
 - ✓ Si présence de trouble, présence de *pseudomonas aeruginosa* d'où un résultat non satisfaisant

4. Recherche de *Staphylococcus aureus*

- L'échantillon est préparé dans l'eau peptonée tamponnée au NaCl
- 100 ml du milieu TSB sont ensemencés avec 10 ml de l'échantillon préparé
- Incuber à 37°C pendant 18 à 48 heures

Lecture

- Absence de trouble donc absence de *Staphylococcus aureus* d'où un résultat conforme
- Présence de trouble dans le TSB ; faire des subcultures sur le milieu Baird Parker
 - Si apparition de colonies noires entourées d'une zone claire, cocci à Gram positif donc présence possible de *Staphylococcus aureus* d'où la nécessité de l'identification
 - ✓ Résultat positif donc produit non conforme
 - ✓ Résultat négatif donc absence de *Staphylococcus aureus* d'où un résultat conforme
 - Absence de colonies noires donc résultat satisfaisant

5. Recherche des *Salmonelles*

- L'échantillon est préparé dans le milieu TSB et est incubé à 37°C pendant 24 heures

- Prélever 1 ml etensemencer 10 ml du milieu au Tetrathionate-Bile-Vert Brillant
- Incuber à 43°C pendant 24 heures

Lecture

- Absence de trouble donc résultat satisfaisant (absence de *salmonelles*)
- Présence de trouble ; réaliser des subcultures sur 2 milieux gélosés parmi les 3 milieux suivants :
 - ✓ (milieu Gélosé au Citrate –Desoxycholate (1)
 - ✓ milieu Gélosé –Xylose-Lysine- Desoxycholate (2)
 - ✓ milieu Gélosé ou Vert Brillant- Rouge de Phénol-Lactose-Saccharose) (3)
- Incuber à 37 °C pendant 18 à 72 heures
 - ✓ La présence de colonies bien développées incolores sur le milieu 1
 - ✓ La présence de colonies bien développées rouges avec ou sans centre noir
 - ✓ Apparition de petites colonies transparentes, incolores ou de colonies dont lacoloration est rose ou blanc opaque entourées d'une zone rose a rouge probable présence des *salmonelles* d'où la nécessité de l'identification
Si positif, donc produit contaminé par *salmonelles*
Si négatif, donc absence de *salmonelles*.

B. Contrôle de stérilité

L'objectif est de vérifier l'absence de contamination bactérienne et fongique dans les substances, préparations et produits qui doivent être stériles selon la pharmacopée. Cet essai est réalisé par deux méthodes principales :

- Méthode de filtration sur membrane
- Méthode d'ensemencement direct des milieux de cultures

Ces deux méthodes sont choisies l'une par rapport à l'autre selon le résultat de l'essai de validation et selon la nature du produit à analyser

L'essai de stérilité consiste à chercher des contaminations microbiennes éventuelles en les mettant dans des conditions de culture et de croissance favorable à savoir la recherche des bactéries anaérobies, bactéries aérobies, les levures et moisissures

La recherche de micro-organismes proposée par la Pharmacopée est basée sur la mise en culture en milieu liquide soit de l'échantillon lui-même (ensemencement direct), soit d'une membrane sur laquelle les micro-organismes ont été recueillis par filtration préalable du produit (filtration sur membrane).

Cet essai concerne les préparations appartenant à la catégorie 1

Catégorie 1 : « Préparations obligatoirement stériles aux termes de la monographie de la forme pharmaceutique correspondante et autres préparations étiquetées stériles. L'essai de stérilité est appliqué pour cette détermination. Dans cette catégorie on distingue les formes pharmaceutiques destinées à la voie parentérale »

Les souches microbiennes utilisées pour le test de validation des 2 méthodes utilisées en stérilité

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P)
- *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404)
- *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)
- *Candida albicans* (ATCC 2091)

1. Echantillonnage

L'échantillonnage doit être fait de telle manière à répondre le plus possible aux exigences du test de stérilité ; des indications sur les quantités minimales à utiliser pour chaque milieu sauf exception justifiée et autorisée de la pharmacopée européenne (Tableau) et le nombre minimal d'unités à examiner

| Produit Stérile | | Quantités |
|--------------------------|---|--|
| Produits liquides | Injecables <ul style="list-style-type: none"> • Volume inférieur à 1mL • 1 mL ou plus mais inférieur à 4mL • 4mL ou plus mais inférieur à 20mL • 20mL ou plus jusqu'à 100mL • Supérieur à 100mL | <ul style="list-style-type: none"> • Le contenu entier d'un récipient • La moitié du contenu d'un récipient 2mL • 10% du contenu, sauf indication contraire • 10% du contenu, avec un minimum de 50mL, sauf indication contraire |
| Produits Solides | Pommades ophtalmiques et dermiques stériles <ul style="list-style-type: none"> • Inférieur à 50 mg • 50 mg ou plus mais inférieur à 200mg • 200mg ou plus | <ul style="list-style-type: none"> • Le contenu entier d'un récipient • La moitié du contenu d'un récipient • 100 mg |

2. Ensemencement

- Technique d'ensemencement direct des milieux de cultures, cette méthode est préconisée selon la nature du produit)
 - Le bouillon Tryticase soja (TSB) et Thioglycolate (Thio) sont ensemencés directement avec les produits à analyser pour la recherche des bactéries, levures et moisissures
 - Après ensemencement des milieux, on incube à 37°C pour le Thioglycolate et 25°C pour le TSB pendant 14 jours

3. Expression des résultats

- ✓ Les résultats sont exprimés par les lectures faites au cours des différentes observations, ils sont comparés aux normes données de la PHARMACOPEE
- ✓ La lecture se fait en observant les cultures le 3eme, 5eme ; 7eme, 10eme et 14eme jour
- ✓ Les cultures huileuses sont agitées doucement chaque jour sauf pour les milieux de détection des bactéries anaérobies strictes afin de maintenir les conditions d'anaérobiose
- ✓ L'observation macroscopique est essentielle pour la détection d'une prolifération microbienne à savoir un trouble, un dépôt ou un voile
- ✓ Pour les produits laiteux, faire une subculture après 7 jours d'incubation
- ✓ S'il n'y a aucune manifestation de croissance microbienne, le produit à examiner satisfait à l'essai de stérilité
- ✓ S'il existe une preuve de prolifération microbienne, le produit ne satisfait pas à l'essai de stérilité, dans ce cas, procéder à des isolements et à une identification des germes en cause et refaire l'essai

4. Interprétations et les critères de validation

- Les milieux ne doivent présenter aucun développement microbien (milieux stériles)
- La croissance des micro-organismes de référence ensemencés doit être précoce et abondante
- La croissance microbienne doit être précoce et abondante, en présence et en absence de produit à examiner, ce dernier ne possède pas un effet antimicrobien et l'essai peut être effectué sans modification.

5. Critères de conformité et de retest

➤ **Critères de conformité :**

- Absence de bactéries aérobies
- Absence de bactéries Anaérobies
- Absence de levures et moisissures

➤ **Critères de retest**

1 ère répétition de l'essai :

- Le nombre d'échantillons choisis à examiner est le même que celui indiqué pour le 1er essai.
- Si aucune manifestation microbienne n'est décelée, le produit est conforme
- S'il y a prolifération, une 2eme répétition de l'essai s'impose

2ème répétition de l'essai :

- Prélever un nombre d'échantillon double que celui qui a été utilisé dans le 1er essai et 1ère répétition de l'essai, s'il n'y a aucune prolifération microbienne, le produit est conforme
- S'il y a prolifération, le produit est déclaré non conforme.

II. Techniques de contrôle toxicologique des préparations

Introduction

Les principaux processus de dégradation d'une préparation pharmaceutique sont l'hydrolyse, l'oxydation et la photodégradation. Par conséquent, les facteurs responsables de la dégradation des médicaments sont l'oxygène, l'eau, la lumière et la température (multiplication des germes)

La dégradation d'un médicament peut conduire à une réduction de l'efficacité thérapeutique, et parfois à une formation des produits à l'origine d'effets indésirables ou toxiques

Les études de **sécurité**, d'**efficacité**, de **disposition** et de **métabolisme** ainsi que les études biopharmaceutiques réalisées chez l'animal ont pour seul et unique but, l'accumulation de données pour répondre aux questions concernant la **sécurité** et l'**activité** souhaitée du médicament potentiel dans l'espèce humaine.

La stabilité d'un médicament peut être définie comme son « Aptitude à conserver ses propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans des limites spécifiées pendant toute sa durée de validité ».

Selon la **Pharmacopée européenne**, les préparations injectables, pour usage humain, doivent satisfaire à l'essai des endotoxines bactériennes (au moyen d'un lysat d'amœbocytes de limules) ou, dans les cas justifiés, à l'essai des pyrogènes (mesure de l'élévation de température chez le lapin).

A. La toxicité anormale

La toxicité englobe l'ensemble des effets néfastes d'une substance sur un organisme vivant. Autrement dit, il s'agit de la capacité inhérente à une substance chimique de produire des effets nocifs chez un organisme vivant et qui en font une substance dangereuse.

La dégradation d'un médicament peut conduire à une réduction de l'efficacité thérapeutique, et parfois à une formation des produits à l'origine d'effets indésirables ou toxiques.

La transformation d'un effet thérapeutique en un effet toxique est le processus par lequel une substance « toxique » entraîne des effets biologiques d'intoxication :

Phase d'exposition : contact avec le toxique et sa résorption

Phase toxicocinétique: débute après la résorption et aboutit à la présence du toxique dans le milieu intracellulaire

Phase toxicodynamique: correspondant à interaction avec le tissu cible

- Les endotoxines bactériennes sont des complexes macromoléculaires toxiques (présents de manière constitutive dans la membrane externe de toute bactérie à Gram négatif) et les métabolites toxiques résultant de la dégradation du principe actif (s) peuvent être à l'origine d'**effets toxiques pour l'organisme**

La dose, la voie d'absorption, le type et la gravité des lésions ainsi que le temps nécessaire à l'apparition d'une lésion définissent : **un effet aigu, un effet chronique ou un effet local.**

Effets toxiques sur certains tissus et systèmes biologiques Irritation et corrosion de l'œil, du tube digestif et de la peau, rythme cardiaque anormal, dépression, nausée, vomissement, neuropathie, urines de couleur anormale..... Etc

L'essai de toxicité anormale d'une préparation est réalisé sur des animaux de laboratoires sélectionnés (5 souris) ou des cobayes. Des signes de toxicité, leur sévérité, apparition, progression et réversibilité doivent être observés et notés en fonction de la posologie. En règle générale, il convient d'observer les animaux pendant au moins 7 à 14 jours

➤ **Essai général**

- ✓ Dissoudre la substance à examiner dans 0,5 ml d'eau pour préparation injectable ou d'une solution stérile d'H₂O tamponnée au NaCl.
 - ✓ Injecter par voie intraveineuse, à 5 souris saines pesant chacune 17 à 24 g, la quantité indiquée dans la monographie; la durée de l'injection est de 15 à 30s.
 - ✓ Le résultat est satisfaisant si aucun des animaux ne meurt dans les 24 h ou pendant la période d'observation indiquée dans la monographie.
 - ✓ Si plus d'un animal meurt, le produit examiné doit être rejeté.
 - ✓ Si l'un des animaux meurt, refaire l'essai: le résultat est satisfaisant si aucun des animaux du 2^{ème} groupe ne meurt au cours de la période d'observation prescrite.
- Cas des immuno-sérums et des vaccins pour usage humain

1^{er} essai (Souris)/ 2^{ème} essai (Cobayes)

Injecter par voie intra-péritonéale à 5 souris de 17 à 24 g et à 2 cobayes pesant chacun 250 à 400 g

Une dose humaine de la préparation à examiner sans dépasser 1ml / animal dans le 1^{er} cas et 5 ml dans le 2^{ème} cas

Observer les animaux pendant 7 jours

Le résultat est satisfaisant si aucun des animaux ne manifeste des signes de maladie. Si

plus d'un animal meurt, le produit est rejeté

Si l'un des animaux meurt ou manifeste des signes de maladie, répéter l'essai

Le produit satisfait à l'essai si aucun des animaux de 2ème groupe ne meurt ou ne manifeste des signes de maladie au cours de la période d'observation prescrite

B. Les pyrogènes

Les médicaments parentéraux sont couramment employés pour traiter diverses maladies. Garantir l'innocuité des médicaments parentéraux largement utilisés exige un suivi et un contrôle stricts, lot par lot, pour éviter toute contamination par des pyrogènes.

La principale substance pyrogène est une endotoxine bactérienne, qui peut provoquer la production de médiateurs de la fièvre par certains globules blancs, en particulier les monocytes et macrophages.

Les effets généraux des endotoxines

- Pyrogénicité entraînant un mal de tête, une myalgie, des nausées...
 - Leucopénie
 - Hypotension pouvant être létale (choc endotoxinique)
- Les tests les plus utilisés sont :
- ✓ Une détection *in vivo* qui consiste à la recherche d'un effet pyrogène chez le lapin.
 - ✓ Une recherche *in vitro*.

Selon la Pharmacopée européenne, les préparations injectables, pour usage humain, doivent satisfaire à l'essai des endotoxines bactériennes (au moyen d'un lysat d'amœbocytes de limules) ou, dans les cas justifiés, à l'essai des pyrogènes (mesure de l'élévation de température chez le lapin).

1. Test du lapin

La détection précoce d'endotoxines a été réalisée en injectant, par voie intraveineuse, dans la veine marginale de l'oreille, l'échantillon à tester, à des lapins et en observant la réponse en mesurant l'augmentation de leur température corporelle qui ne doit pas dépasser 1.15 °C.

Les lapins ont une tolérance aux endotoxines similaire à celle des humains ce qui constitue donc un choix idéal. Cependant, cette méthode est coûteuse, lente et peu sensible. Mais le principal inconvénient de ce test est peut-être son incapacité à quantifier le niveau d'endotoxine.

Lapins albinos de race néo-zélandaise (1.5 – 4 Kg)

La mesure de la température se fait en plaçant des sondes thermiques dans le rectum des lapins d'expérience.

Essai préliminaire: dont le but est de :

- ✓ choisir les lapins candidats pour l'essai définitif
- ✓ éliminer les lapins hypersensibles
- ✓ valider l'eau physiologique et les seringues.

Essai définitif : permet de s'assurer de la conformité du produit

1. 1. Technique

Sélection des animaux

L'essai est pratiqué sur des lapins adultes, en bonne santé mâles ou femelles et dont la masse corporelle ≥ 1.5 kg. Ils doivent être nourris suivant un régime complet, équilibré et exempt d'ATB. Sont exclus de l'essai les animaux :

- ✓ qui ont été utilisés dans une recherche négative de pyrogènes pendant les 3 jours précédents
- ✓ qui ont été utilisés dans les 3 semaines précédentes dans un essai ayant révélé la présence de pyrogènes

Priver les lapins de nourriture pendant la nuit précédant l'essai et jusqu'à la fin de ce dernier et d'eau pendant l'essai. L'essai doit être effectué dans un lieu calme où aucune perturbation ne risque d'exciter les animaux et dont la température ambiante ne s'écarte pas de plus de 3°C de celle de la pièce où les lapins ont séjourné pendant au moins les 18 h précédant l'essai. Mesurer Les températures des lapins.

1.2. Essai préliminaire

1 à 3 jours avant l'essai du produit; traiter, parmi les animaux sélectionnés, ceux qui n'ont pas été utilisés pendant les 2 dernières semaines en leur injectant par voie intraveineuse et par kg de la masse corporelle, 10 ml d'une solution apyrogène au NaCl à 0.9 % stérile et chauffée à 38.5°C Mesurer la t ° de chaque lapin à partir de 90 mn au moins avant l'injection et pendant les 3 h qui suivent. L'animal qui accuse une variation de t ° > 0.6 °C est exclu de l'essai.

1.3. Essai définitif

L'essai est effectué sur un groupe de 3 lapins

- ❑ Mesurer la t ° initiale pour chaque lapin (2 valeurs déterminées à un intervalle de 30 mn dans les 40 mn précédant l'injection, faire la moyenne; c'est la température initiale) Exclure de l'essai les lapins accusant une variation dépassant 0.2°C entres 2 lectures successives dans la détermination de la température initiale.

- ❑ Chauffer à 38.5°C la solution à examiner préparée dans une solution apyrogène au NaCl à 0.9% stérile puis injecter lentement la solution dans la veine marginale de l'oreille du lapin (< 4 mn) (quantité donnée par la monographie mais ≥ 0.5 ml et est ≤ 10 ml par kg)
- ❑ Mesurer la t de chaque lapin à des intervalles réguliers de 30 mn au max à partir de 90 mn au moins avant l'injection de la solution à examiner et pendant les 3 h qui suivent
- ❑ Calculer la t° initiale (moyenne de 2 valeurs déterminées à un intervalle de 30 mn dans les 40 mn précédant l'injection de la solution à examiner)
- ❑ Calculer la t° maximale (la température la + élevée notée dans les 3h suivant l'injection de la solution à examiner)

La réponse de l'animal est définie par la différence entre la t ° maximale et initiale moyenne de chaque lapin: lorsque cette différence est négative, le résultat doit être considéré comme zéro

Exclure de l'essai les lapins accusant une variation dépassant 0.2°C entre 2 lectures **successives** dans la détermination de la température initiale (utiliser seulement les lapins dont les températures initiales ne s'écartent pas les unes des autres de plus de 1°C)

Exclure de l'essai les lapins dont la t° initiale est > 39.8°C ou < 38°C

| Nombre de lapins | Produit satisfaisant si la somme des réponses n'est pas > à | Produit non satisfaisant si la somme des réponses est > à |
|------------------|---|---|
| 3 | 1.15°C | 2.65°C |
| 6 | 2.80°C | 4.30°C |
| 9 | 4.45°C | 5.95°C |
| 12 | 6.60°C | 6.60°C |

2. LAL Test

Le sang de limule est extrêmement sensible à la présence de bactéries à Gram négatif de sorte que la coagulation du sang se produit au contact de très faibles quantités d'endotoxines injectées Les limules mouraient par coagulation intra vasculaire

Le test LAL est une méthode semi quantitative in vitro basée soit sur une coagulation soit un trouble soit une coloration jaune selon la technique employée, d'un lysat de protéines

d' amébocytes d'un crabe d'Amérique (LAL Limulus Amoebocyte Lysat)

Ce phénomène de coagulation de l'hémolymphe de *Limulus polyphemus* est à la base de l'essai au lysat d'amoebocytes de limule (LAL) (pour la détection *in vitro* des endotoxines bactériennes)

Une injection d'endotoxines dans la circulation sanguine provoque à partir de 5 EU (unité endotoxine) ou UI/Kg/h de poids corporel (ce qui correspond à environ 0.5 ng d'endotoxine purifiée) :

Les effets remarquables sont :

- ✓ Maux de tête
- ✓ Hypotension.
- ✓ Coagulation intra vasculaire disséminée.
- ✓ Choc pouvant aboutir à la mort.

Les endotoxines activent une **proenzyme** coagulante qui réagit avec une protéine présente dans le LAL (**le coagulogène**) pour former un gel ferme de **coaguline**

Le test utilise un extrait nommé LAL (Lysat d'Amoébocytes de Limules), ce lysat a la propriété de coaguler en présence de quantités infimes d'endotoxines bactériennes

Il est impératif d'utiliser de la verrerie, de l'eau, des réactifs totalement exempts d'endotoxines (les sensibilités des lots de LAL vont de 0.03 à 0.50 UE (éviter les faux positifs) ; Les solutions utilisées pour ce test doivent être limpides avec aspect macroscopique correct et ne pas renfermer de particules visibles à l'œil nu ; les émulsions doivent avoir un aspect homogène et ne pas présenter de séparation de phases ; les suspensions peuvent présenter une sédimentation mais une légère agitation doit redonner une suspension suffisamment stable pour permettre des prélèvements homogène.

2.1. Le test *in vitro* de l'essai au Lysat d'amoebocytes de limule (LAL)

Le dosage des endotoxines bactériennes se fait par une réaction enzymatique réalisée *in vitro* à l'aide d'un réactif, le réactif lyophilisé, le **Lysat d' amoebocytes de limule (LAL)**.

Préparation du lysat

Les amoebocytes du sang de limule sont séparés par centrifugation, le culot est lavé puis lysé. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation et le surnageant est stocké à +4°C pendant plusieurs mois ou congelé à -20°C ou lyophilisé.

La sensibilité de chaque lot est déterminée et parfois ajustée par élimination totale ou partielle d'un facteur inhibiteur par extraction chloroformique. Certains lysats sont tamponnés et de cations divalents, en particulier Mg²⁺, sont ajoutés à différentes concentrations selon les réactifs

Les résultats obtenus par cette méthode sont donnés en unités de masse par volume de liquide ou d'air (ng /ml ou ng /m³) ou en masse par masse (ng /mg). Pour éviter des fluctuations dans les résultats en changeant de lots de LAL ou d'endotoxines, la « Food and Drug Administration » (FDA) a mis au point une endotoxine étalon de **référence** RSE

(Référence Standard Endotoxine) à partir d'*Escherichia coli* ; elle est nommée EC-5 et a un potentiel fixé à 10 unités d'endotoxines (EUS) par échantillon ce qui est équivalent à 10 EU/ng d'*Escherichia coli*.

Ainsi la FDA a exigé que tous les fabricants indiquent la sensibilité de chaque lot de LAL par rapport à l'étalon EC-5 RSE. Les fabricants indiquent généralement dans leur kit de dosage une endotoxine étalon de contrôle (CSE) calibrée à l'aide de RSE pour chaque lot de lysat

Pour chaque essai ; un témoin + et un témoin – doivent être réalisés.

2.2. Les différentes méthodes

2.2.1. Méthode par gélification

Cette méthode repose sur la propriété qu'ont les endotoxines en très faible quantité de coaguler du LAL. Des quantités équivalentes de LAL et de solution à tester sont placées dans des tubes en verre apyrogène, mélangées puis mises en incubation à 37°C pendant une heure. A la fin de l'incubation les tubes sont retournés si le gel s'est formé la **réaction est positive**. De plus Ce test permet, après avoir déterminé la sensibilité du LAL, d'évaluer la concentration minimale d'endotoxine produisant la coagulation du LAL. Image a modifié

Par dilutions successives d'une endotoxine de référence dont la concentration est connue, on détermine la pour laquelle la coagulation se produit. En divisant ce facteur de dilution par la concentration d'endotoxine standard, on obtient la sensibilité du LAL.

Une procédure similaire permet de calculer la concentration d'endotoxine dans un échantillon. En multipliant le plus grand facteur de dilution pour lequel la gélification se produit par la sensibilité du LAL, on peut extrapoler la concentration maximale d'endotoxine dans l'échantillon

2.2.2. Méthode de turbidimétrie

Cette méthode repose sur le même principe que le précédent

La turbidimétrie (densité) d'un liquide augmente quand il coagule. Le LAL est dilué de sorte qu'il n'y ait pas de coagulation possible. Quand les endotoxines sont ajoutées au LAL dilué, la solution floccule et sa turbidité est fonction de la concentration en endotoxines. Une courbe d'étalon est réalisée (absorbance en fonction de la concentration en endotoxine de référence) à l'aide de dilutions successives d'une endotoxine de référence, cette courbe permettant de déterminer la concentration en endotoxines dans un échantillon. On mesure l'absorbance à 380 nm, Des logiciels permettent d'enregistrer les absorbances en fonction du temps, de calculer le temps de réaction, de visualiser la cinétique de la réaction dans chaque tube, de tracer la droite: logarithme de la concentration en endotoxines en fonction du logarithme du temps de latence.

2.2.3. Méthode chromogénique

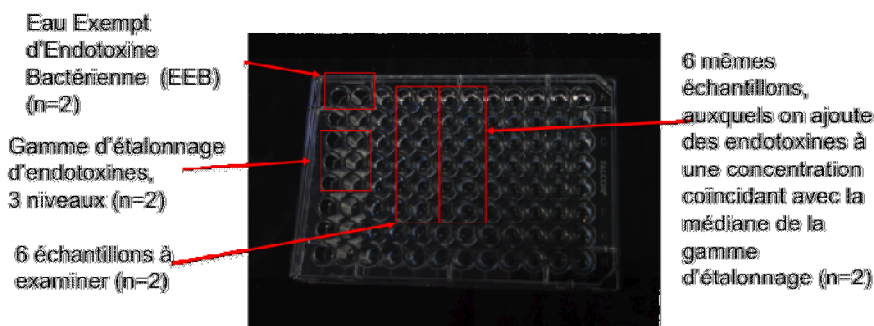
Dans cette méthode, le LAL (lyophilisat bampone débarrassé du coagulogène) est combiné à une substance chimique : Le 5 aminoacide polypeptide (5 pep) lié à la paranitroaniline (*p*NA).

Sous l'action de la coagulase activée, la liaison 5 pep -PNA est coupée libérant ainsi le *p*NA, qui est mesuré par spectrophotométrie et absorber à 405 nm.

La vitesse de libération du *p*NA est fonction de la concentration en endotoxines dans l'échantillon. Le *p*NA ainsi libéré, coloré en jaune la solution. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de *p*NA libérée.

Plus la concentration d'endotoxines est élevée, plus le temps de réaction est court. Le test requiert une instrumentation spécialisée pour incuber plusieurs échantillons à une température contrôlée (généralement 37°C) et pour mesurer la densité optique à intervalles réguliers.

On trace la courbe des absorbances en fonction des concentrations d'endotoxines. La connaissance de la densité optique de l'échantillon permet, grâce à la courbe, de calculer la concentration en endotoxine.



Le logiciel d'analyse fournit :

| Micropuits concernés | Paramètres donnés par logiciel | Résultats attendus |
|------------------------------------|---|--|
| Etalons d'endotoxines bactériennes | La droite d'étalonnage : temps de réaction (moyenne des 2 puits en seconde) en fonction de la concentration en endotoxines bactériennes (EU/mL) | le coefficient de corrélation de la droite d'étalonnage doit être $\geq 0,98$ |
| Eau EEB | [endotoxines] dans l'eau EEB | [endotoxines] doit être inférieur au niveau le plus bas de la gamme d'étalonnage |
| Échantillons dopés | Taux de recouvrement | 50-200% |
| Échantillons | [endotoxines bactériennes] | Données recherchées ! |

Ces méthodes sont rapides, spécifiques, simples à réaliser et très sensibles. La limite de détection dépend de la méthode et de l'instrumentation utilisée ; la sensibilité peut atteindre 0.001 unité d'endotoxine (UE) par mL. Si la courbe d'étalonnage par régression linéaire satisfait à tous les critères d'acceptation, des courbes d'étalonnage peuvent également être établies en utilisant la régression polynômiale.

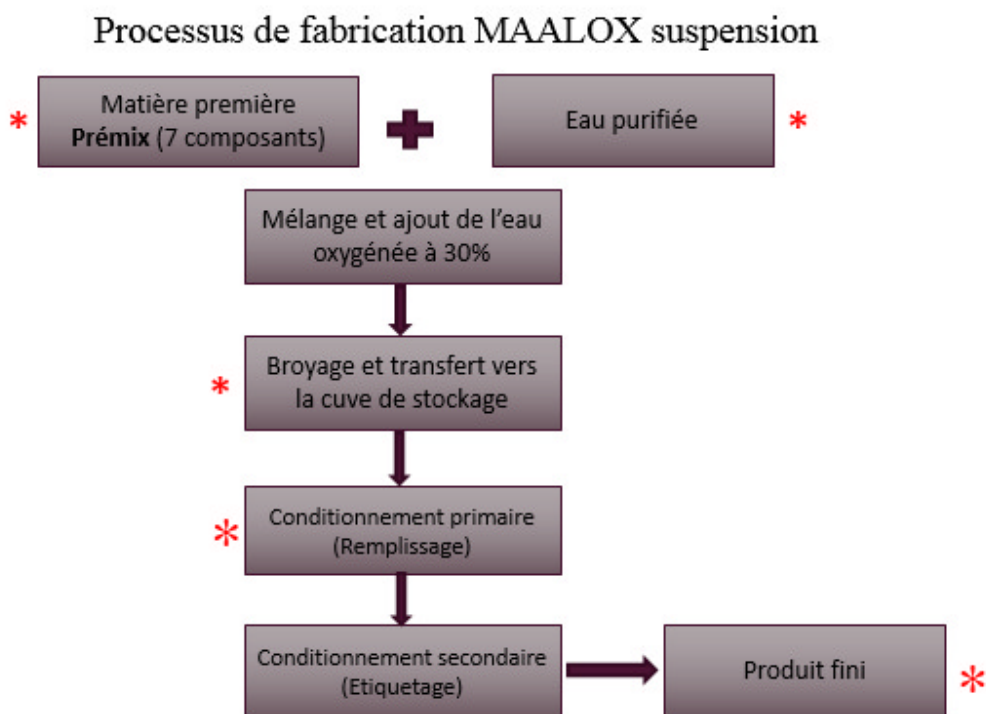
III. Contrôle physico-chimique des préparations

L'industrie pharmaceutique est le secteur industriel chargé de la conception, de la fabrication, du conditionnement et de la commercialisation des produits pharmaceutiques.

Elle doit fabriquer et fournir des médicaments adaptés à l'emploi, répondant aux exigences du dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) et n'exposant les utilisateurs à aucun risque lié à des carences en matière de sécurité, de qualité ou d'efficacité. Pour cela la réalisation d'un **contrôle de la qualité** est une procédure obligatoire au cours de la fabrication des préparations.

Les analyses physico-chimiques contribuent à l'appréciation de la qualité physico-chimique d'une préparation donnée. Assurer que la préparation, contient le principe actif (s) ainsi que les excipients prévus par la formule prescrite par la pharmacopée Européenne (identification et dosage)

Exemple d'une chaîne de fabrication d'une préparation pharmaceutique (dans ce cas la Maalox)



* = points de prélèvement pour le contrôle

Les techniques de Contrôle physico-chimiques des préparations reposent sur :

- ✓ Les méthodes chimiques basées sur des réactions chimiques (ex : recherche et dosage des nitrates ; du chlore, des métaux lourds...etc.).
- ✓ Les méthodes purement physiques, qui utilisent les propriétés physiques de la matière (La friabilité, la résistance, la taille, la couleur, la résistanceetc.).
- ✓ Les méthodes physico-chimiques, qui impliquent des réactions électrochimiques (Méthodes chromatographiques).

Cas du contrôle physico-chimique de l'eau purifiée

| Analyses | Normes Pharmacopée |
|----------------------------|----------------------------------|
| Aspect et couleur | Liquide limpide et incolore |
| Saveur | Insipide |
| pH | $5 < \text{pH} < 7$ |
| Conductivité électrique | $\leq 1 \mu\text{S} / \text{cm}$ |
| Les substances oxydables | Abs |
| Les chlorures | Abs |
| Les Nitrates NO_3 | $\leq 0.2\text{ppm}$ (trace) |
| Les Sulfates | Abs |
| Ammonium | Abs |
| Le Calcium et le Magnésium | Présence (traces) |
| Les métaux lourds | $\leq 0.1 \text{ ppm}$ |

Conductivité électrique

La conductivité d'une substance est définie comme « l'habilité ou la puissance de la substance à conduire ou transmettre le courant électrique. Cette conductivité est fortement dépendante du nombre d'électrons disponibles, autrement dit du nombre des métaux retrouvés dans la solution.

Le but de l'analyse consiste à évaluer rapidement la minéralisation globale de l'eau par un **conductimètre** muni d'une électrode de platine.



Recherche de traces des métaux lourds

- Les métaux lourds (ex plomb) sont des impuretés provenant des procédés de fabrication des substances pharmaceutiques. Ils sont toxiques même à faibles concentrations.
- Le test est une analyse semi-quantitative où l'intensité de la coloration, après réaction de la solution à examiner, est comparée à une solution témoin de plomb.

Présence des chlorures

- Les chlorures présentent une saveur désagréable qui va conférer à l'eau une saveur saline. Ils peuvent également provoquer une corrosion dans les canalisations et les réservoirs.
- La teneur en chlorures est déterminée par argentimétrie (Réaction des chlorures avec le nitrate d'argent qui donne un précipité blanc).



Présence des nitrates

- L'absence d'oxygène fait que les bactéries ont recours à l'utilisation de nitrate pour leur respiration (*Pseudomonas aeruginosa*)

- La présence des nitrates dans l'eau est déterminée par **colorimétrie** (en présence de nitrates NO_3 il apparaît une coloration bleue suite à l'oxydation de la diphénylamine par les nitrates)



Détermination du pH

Détermination de l'alcalinité ou de l'acidité du produit à analyser à l'aide du **pH mètre**.



Détermination des caractères organoleptiques

Faire une description complète du produit selon la forme (aspect), la couleur et sa saveur (Examen visuel).

Autres méthodes :

Détermination du poids moyen

Peser individuellement 10 unités (suppositoires, comprimés...etc) et faire la moyenne de leurs poids.

Détermination de l'uniformité de masse

- Peser 20 unités une par une, la masse individuelle de 2 au plus des 20 unités peuvent s'écarter du poids moyen de 5 %, mais la masse d'une unité ne peut s'en écarter de plus de 10%.

- Normes: Les poids individuels doivent se trouver dans les limites de 5% de poids moyen par maxdeux unités pouvant se situer entre 5 et 10% mais aucune supérieure à 10%.

Détermination du taux de friabilité

Ce test est destiné à déterminer la friabilité des comprimés non enrobés obtenus par compression; c'est l'endommagement ou l'abrasion de la surface des comprimés sous l'effet de choc mécanique grâce à **un friabilimètre** (4min/100 tour/min)



Détermination de la solubilité

Vérification de la solubilité du produit dans plusieurs solvants: l'eau, le méthanol et l'alcool.

Dosage du principe actif

Il permet de préciser la quantité du principe actif dans le produit pharmaceutique, le plus souvent le dosage est réalisé par des méthodes volumétriques ou spectrophotométriques.

Détermination du temps de désagrégation

Maîtriser la plus au moins grande aptitude des médicaments (suppositoires et comprimés) à se désagréger en milieu liquide à une température donnée dans un temps prescrit. L'essai est réalisé à l'aide d'un appareil contenant une cuve remplie d'eau dont la température est maintenue à (36 – 37°C).

Normes: Le temps de désagrégation ne doit pas dépasser **30 min.**

Détermination de la perte à la dessiccation

Cet essai permet de connaître le taux d'humidité du médicament (degré d'hydratation) qui peut avoir des conséquences sur l'aptitude au traitement, la durée de conservation, la fonctionnalité et la qualité d'un produit.

Le test consiste à introduire le médicament dans un dessiccateur programmé à une température de **105°C** pendant **30mn** puis à comparer le poids avant et après dessiccation.



Tous les tests appliqués lors des procédés de contrôle physico-chimique des préparations doivent être conformes aux normes relatives dans **la Pharmacopée Européenne** (référence) avant leur distribution.

✚ Exercice

L'analyse bactériologique d'une urine infectée donne le tableau de résultats suivant, sachant que l'on a ensemencé 0,1 ml de chaque dilution par boîte de milieu de culture.

| Dilution | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Essai 1 | inc | 490 | 95 | 2 |
| Essai 2 | inc | 501 | 110 | 0 |
| Essai 3 | inc | 520 | 120 | 5 |

inc : incomptable

- Définissez une colonie.
- Quelle dilution doit-on utiliser pour réaliser le dénombrement ?
- Déterminez le nombre de bactéries par ml d'urine.
- Le dénombrement bactérien sur le même échantillon d'urine, par la méthode directe au microscope optique, a donné 15×10^5 bactéries /ml, comparer les deux résultats et interpréter.

Chapitre 3

Techniques d'immuno- marquages et d'immuno- détectons

Ces dernières décennies ont connu une importante avancée dans le domaine des biotechnologies. Des nouveaux outils d'analyse multiparamétriques ont permis d'envisager des concepts et des applications dans de nombreux domaines. Le domaine de la santé est sans doute celui qui a le plus été marqué par le développement de ces systèmes. Ils ont permis d'une part une meilleure compréhension de certains mécanismes permettant le criblage des interactions pour des banques de protéines, et aussi dans la recherche de nouveaux médicaments, ou encore la mise au point de nouveaux tests de diagnostic.

1. Définition

L'**immuno-marquage** est une technique de biologie cellulaire où une protéine exprimée par une cellule est détectée et localisée par un anticorps de synthèse. L'anticorps est marqué de manière à être visible en lumière naturelle en microscopie optique, ou en immunofluorescence.

2. Types de marquages

1. Marquage par une enzyme dans les techniques d'immuno-enzymologie (**EIA: immuno-enzymolgy assay**). Le produit coloré formé par catalyse enzymatique est dosé par photométrie.
2. Marquage par un fluorochrome dans les techniques d'immunofluorescence (**IFA: immunofluorescence assay**). La lecture se fait par microscopie ou fluorimétrie grâce à l'émission de fluorescence.
3. Marquage par un isotope radioactif dans les techniques de radio-immunologie (**RIA: radio-immunoassay**). Le dosage se fait par autoradiographie grâce à l'émission de rayonnements.

3. Détection par marquage

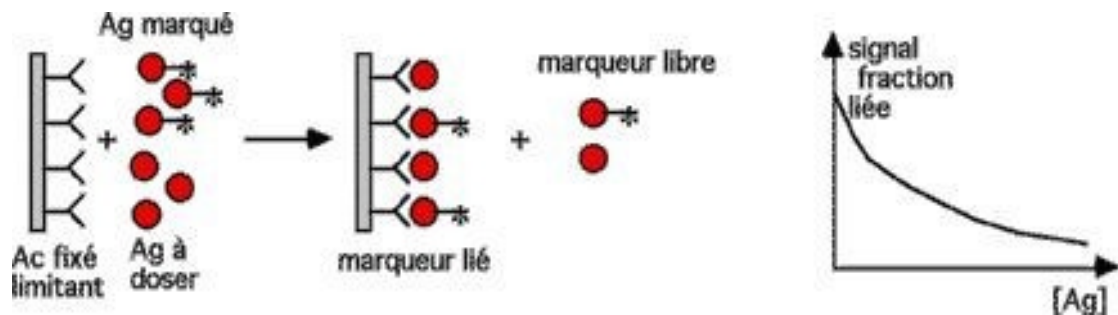
- La réaction Ag-Ac est visible grâce à un marquage par un traceur.
- Le marquage peut se faire sur l'Ag, l'Ac ou une Ig formant le conjugué.
- Dans les techniques en phase homogène (liquide), le marqueur est modifié par la réaction Ag-Ac et une séparation de Ag-Ac marqué n'est pas nécessaire; contrairement aux techniques en phase hétérogène (sur support), dans les quelles le comportement du marqueur n'est pas modifié par la réaction Ag-Ac (nécessite un lavage).

- Le réactif peut être limitant (dosage par compétition) ou en excès (dosage sans compétition).
- Les méthodes par marquage peuvent être directes ou indirectes.
- Les techniques par marquage sont plus sensibles, plus fiables et plus rapides.

4. Méthodes de dosages

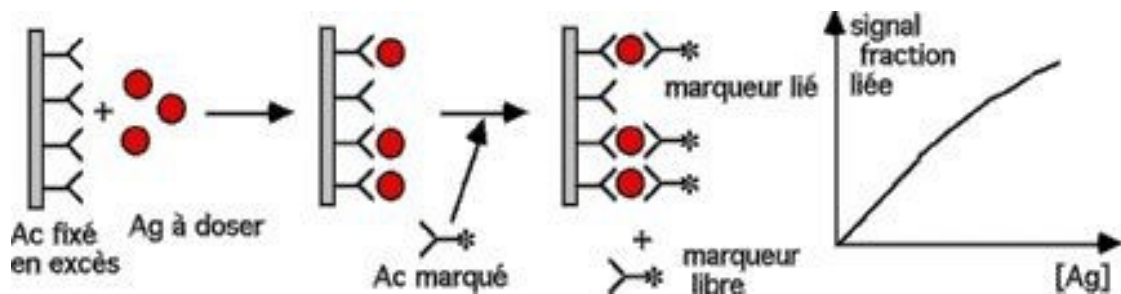
1. Avec compétition

Ag à doser entre en compétition avec l'Ag*. Ag*-Ac est inversement proportionnel à l'Ag à doser. (EIA, IFA, RIA).



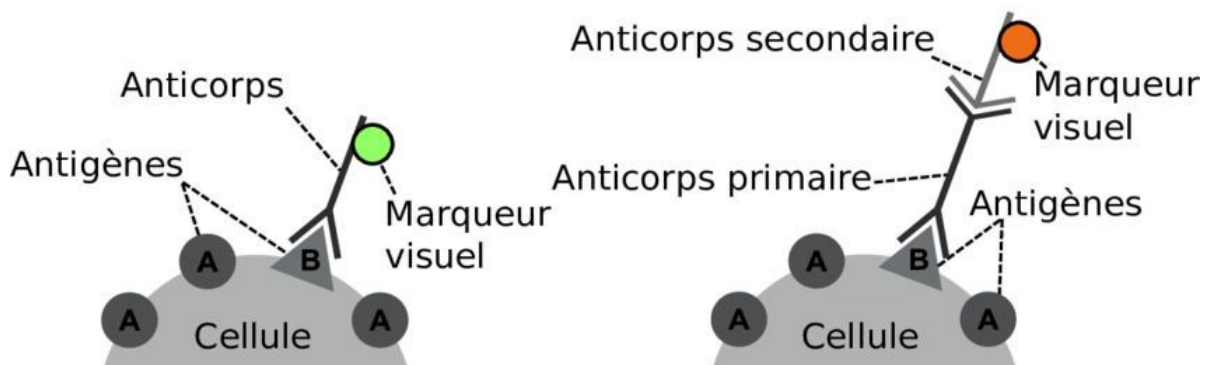
2. Sans compétition

Tous l'Ag à doser est lié à l'Ac fixé et est révélé par un autre Ac*.



Ag à doser est proportionnel au marquage détecté. Plus sensible (ELISA, IFMA, IRMA).

3. Marquage directe et indirecte



| | |
|---|--|
| Méthode directe Un seul réactif est ajouté, puis lavage. | Méthode indirecte Réactifs ajoutés successivement et lavage entre deux réactifs ajoutés |
|---|--|

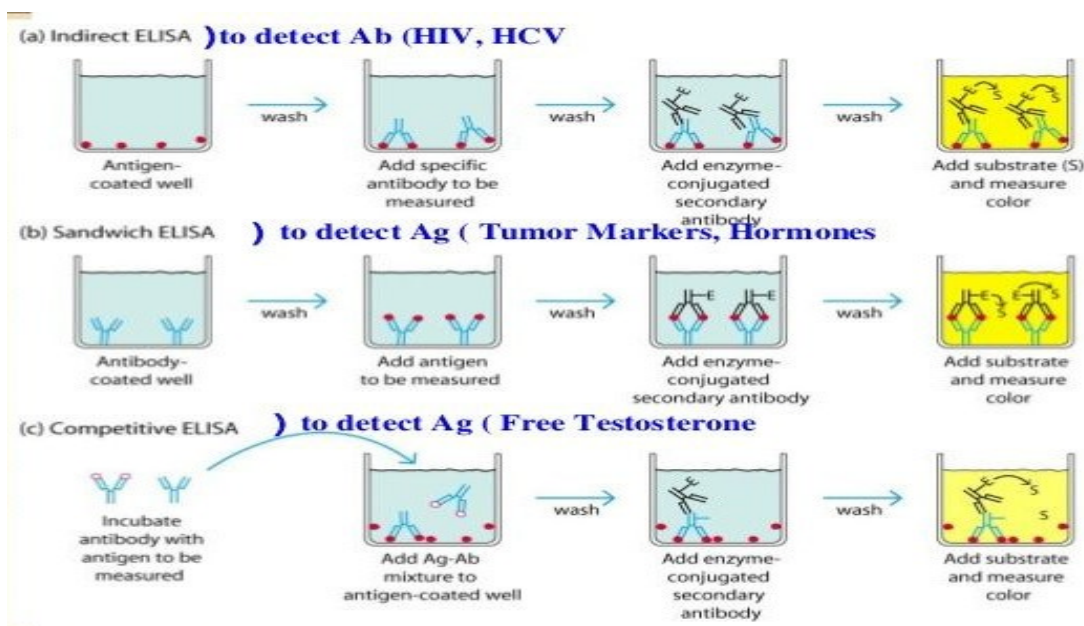
I. Immuno-enzymologie

- Marquage par enzymes (peroxydase de Raifort, phosphatase alcaline, B-galactosidase...).
- Révélation de Ag-Ac marqué par l'enzyme en présence de son substrat spécifique incolore donnant un produit coloré.

pNPP incolore → pNP jaune
- Choix de l'enzyme et du substrat: pureté, bonne conservation, degré de conversion élevé, absence dans le milieu étudié.
- Le produit est mesuré par spectrophotométrie ou colorimétrie.
- Dosage grâce à une courbe d'étalonnage.
- Le couplage de l'enzyme se fait par le système biotine-avidine, ayant une affinité l'une par rapport à l'autre. Et le couplage chimique grâce au glutaraldéhyde.

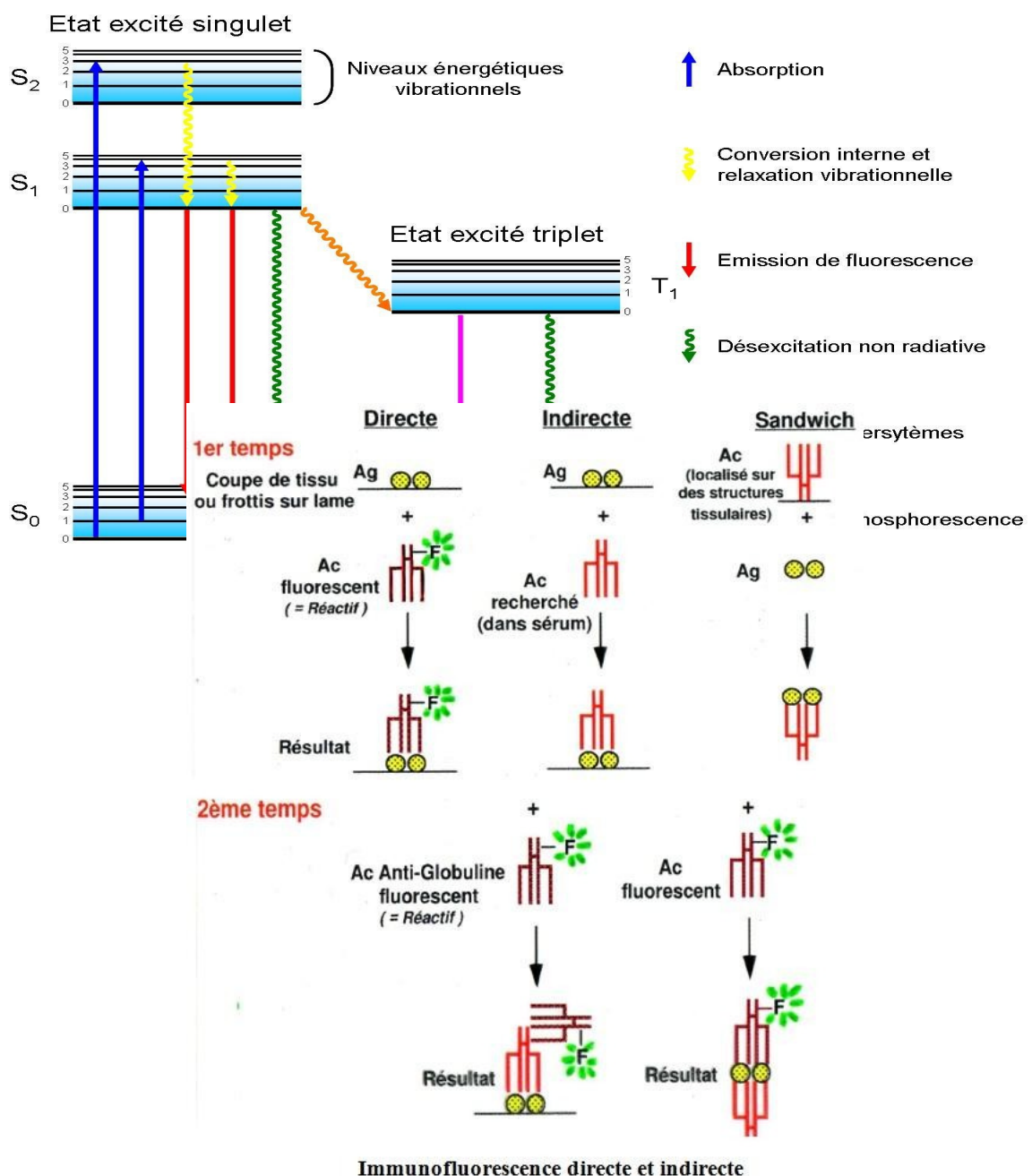
| Enzymes | Substrats | Produits |
|------------------------------------|---|--|
| Phosphatase alcaline | PNPP (4-nitrophényl-phosphate) incolore | PNP (4-nitrophénol) (jaune) 405 nm |
| Peroxydase | H ₂ O ₂ + OPD (orthophénylène diamine) H ₂ O ₂ + luminol | Produit coloré (orange) Produit luminescent |
| -galactosidase | ONPG (2-nitrophényl - galactoside) | ONP (2-nitrophénol) (jaune) 405 nm |
| Glucose 6-phosphate déshydrogénase | Glucose 6-phosphate + NAD ⁺ ou NADP ⁺ | NADH ou NADPH, 340 nm |

ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent assay)



II. Immunofluorescence

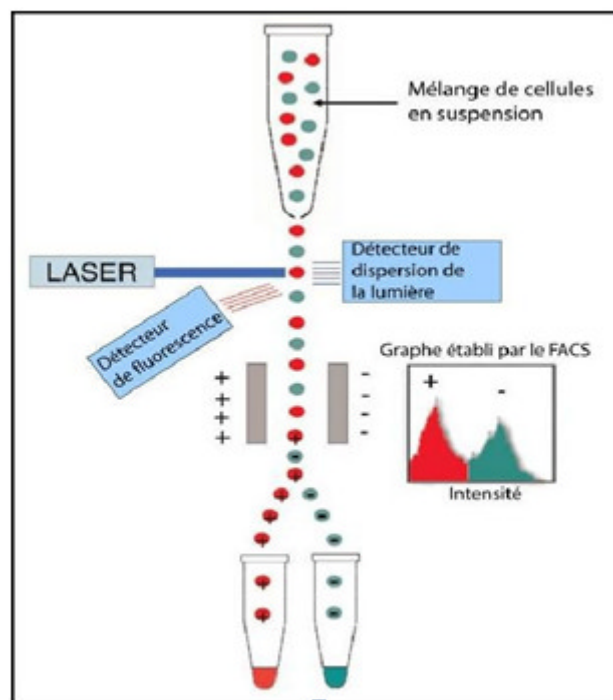
- Conjugaison de l'Ac, de l'Ag ou de d'Ig au fluorochrome (fluorescéine, FITC, rhodamine...) et excitation par une lumière permettant l'absorption des rayonnements et émission d'une lumière fluorescente (ex : verte pour la fluorescéine).
- Marquage direct des tissus infectés, identification des microorganismes dans les prélèvements, étude de l'écologie des microorganismes sans isolement...
ex: *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis*, virus respiratoires...
- Comptage de cellules marquées et immunophénotypage (microscope à fluorescence et cytométrie de flux).



III. Cytométrie de flux (FACS)

Analyse d'un échantillon hétérogène avec différents fluorochromes (Ac monoclonaux marqués avec des agents fluorescents).

- Passage des cellules marquées devant un faisceau laser activant la fluorescence.
- Mesure des intensités de fluorescences pour différentes longueurs d'ondes.
- Enregistrement de l'intensité de fluorescence de chaque cellule grâce à des photomultiplicateurs.
- L'analyse des résultats détermine la taille, la granulosité, et la concentration des cellules. (ex: lymphocytes atteintes au cours d'une infection par le virus HIV)
- Inconvénient de réactions croisés d'Ag très proches (ex: différentes entérobactéries avec un même marquage).

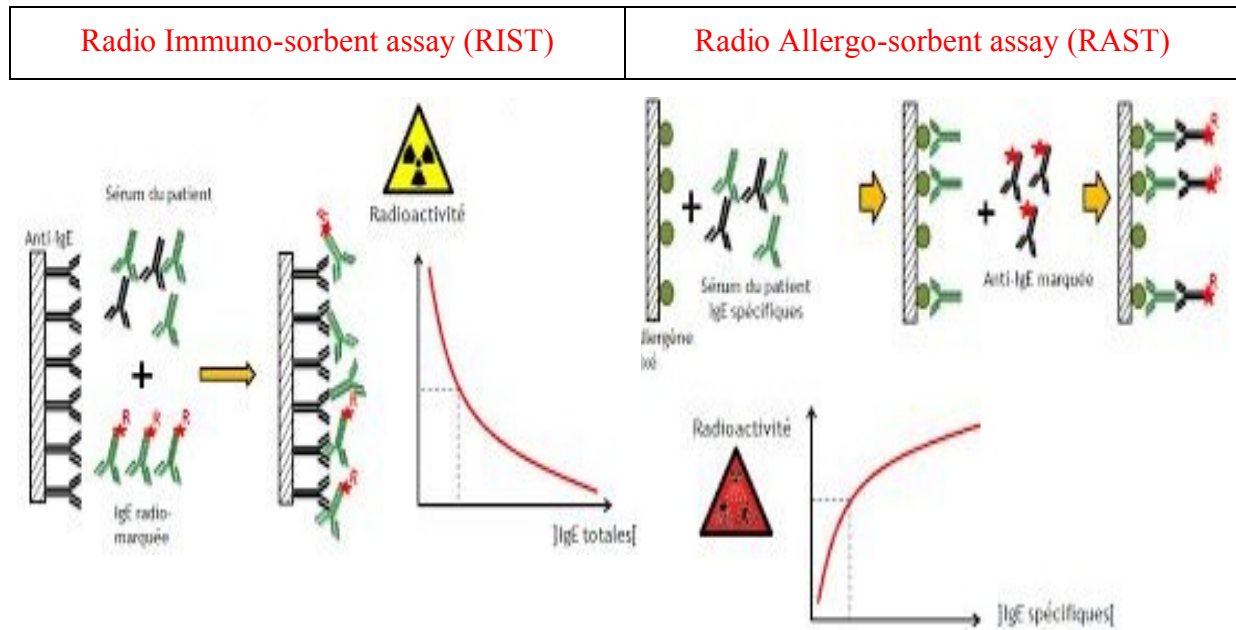


IV. Radio-immunologie

- Techniques très sensibles (sensibilité du dosage ng/ml).
- Isotopes radioactifs: C^{14} , H^3 , I^{125} (demi-vie de 60 jours/ rayonnements gamma quantifiés par compteur gamma).
- Le marquage par isotopes radioactifs est facile et direct.
- L'utilisation des isotopes radioactifs est limitée à cause de l'effet des radiations et la

décroissance de la radioactivité.

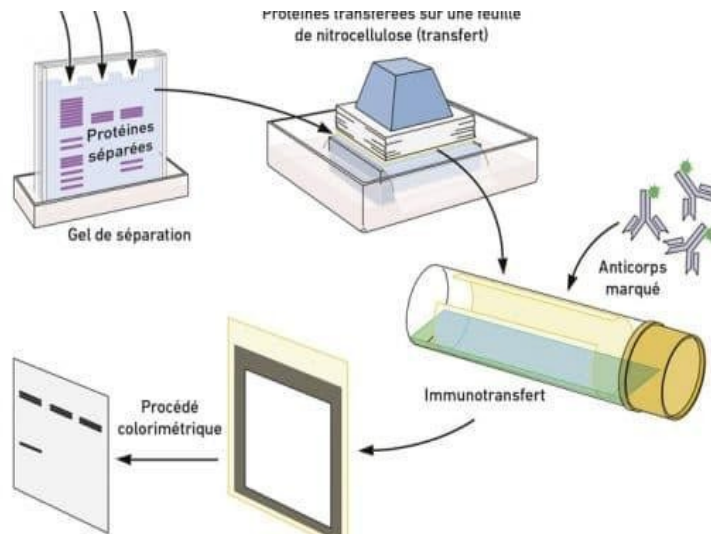
- Dosage d'hormones, recherche de stupéfiants, de marqueurs tumoraux...



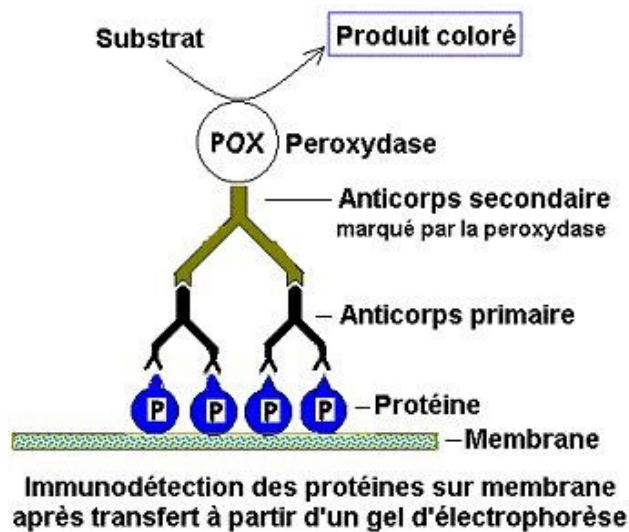
| | |
|---|--|
| Technique avec compétition, signal inversement proportionnel à la concentration | Technique en sandwich, sans compétition, signal directement proportionnel à la concentration |
|---|--|

V. Immunoblot

- Séparation de protéines d'un échantillon biologique ou sérum d'un patient (ex: protéine d'un agent infectieux), en fonction de leurs poids moléculaires par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.
- Transfert sur membrane de nitrocellulose et incubation en présence d'anticorps spécifiques non marqués (Ac primaires).
- Elimination des Ac non spécifiques par lavage.
- Révélation des protéines grâce à l'anticorps secondaire Ac anti-Ig marqués par radio isotope ou par une enzyme (peroxydase).



- La peroxydase est utilisée avec un agent luminescent. le produit émet une luminescence proportionnelle à la concentration en protéine.
- La détection se fait par une caméra à CCD.
- Parfois un marqueur radioactif (isotope radioactif de l'iode) est couplée à l'anticorps secondaire (ex: marquant la protéine A du staphylocoque).



Exercice

Quel sont les différentes techniques d'immuno-marquages ainsi que le marqueur utilisé ?

| Technique | Marqueur utilisé |
|-----------|------------------|
| | |

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] GENOPOLE. « Les Biotechnologies - Le développement des biotechnologies : quelques repères historiques ». Consulté le 3 mai 2017. <http://www.genopole.fr/IMG/pdf/reperes-dev-biotechnologie.pdf>.
- [2] LEEM. « Les Biotechnologies au coeur de l'innovation ». <http://www.leem.org/les-biotechnologies-au-coeur-de-linnovation>.
- [3] KINCH, MICHAEL S. « An Overview of FDA-Approved Biologics Medicines ». *Drug Discovery Today* 20, no 4 (Avril 2015): 393-98.
- [4] GENZYME. Biopharmaceutical manufacturing is inherently complex. https://www.sec.gov/Archives/edgar/data/732485/000110465910030452/a10-9595_14defa14a.html.
- [5] LATIEULE SYLVIE. « Culture cellulaire : Trois étapes clés pour produire des protéines thérapeutiques », 4 Janvier 2011. <http://www.industrie.com/pharma/culture-cellulaire-trois-etapes-cles-pour-produire-des-proteines-therapeutiques>, 39248.
- [6] MARC A., OLMOS É. « Procédés de culture en masse de cellules animales », *Techniques de l'ingénieur*, 11 Octobre 2010.
- [7] WURM F. M. « Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells ». *Nature Biotechnology* 22, no 11 (Novembre 2004): 1393-98.
- [8] BIONIQUE TESTING LABORATORIES. Creating a certified working cell bank for important cell lines in your research program. <http://www.bionique.com/mycoplasma-resources/technical-articles/certified-working-cell-bank.html>.
- [9] GRUGIER J., Bertrand G. « La filtration tangentielle en Bioproduction ». *La Vague*, avril 2014. 78
- [10] CHIMIE PHARMA HEBDO. « De la difficulté de formuler les bioproduits », 1 décembre 2009. <http://www.industrie.com/chimie/de-la-difficulte-de-formuler-les-bioproduits>, 25114.
- [11] SINCLAIR ANGUS M., STEVE Elliott. « Glycoengineering: The Effect of Glycosylation on the Properties of Therapeutic Proteins ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94, no 8 (Août 2005): 1626-35.
- [12] HANS B., JEAN-PIERRE W. « L'approche processus »— Editions d'Organisation.
- [13] ANSM, Les Bonnes Pratiques de Fabrication. N° 2015/12 bis, 2016.
- [14] EMA, European Medicines Agency, Qualification and Validation, Eudralex volume 4 : EU guidelines to Good Manufacturing Practices § Annex 15 (2015).
- [15] DR KHALED. H, Les techniques immunologiques avec marquage, module d'immunologie.
- [16] ABDUL G ., DENIS H. Immunologie - Chapitre dix-sept réactions d'hypersensibilité.