



Problématiques de formulations de protéines thérapeutiques destinées à la voie injectable

Virginie Fayolle

► To cite this version:

Virginie Fayolle. Problématiques de formulations de protéines thérapeutiques destinées à la voie injectable. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01610200

HAL Id: dumas-01610200

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01610200>

Submitted on 11 Oct 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES
UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2017

PROBLEMATIQUES DE FORMULATIONS DE PROTEINES THERAPEUTIQUES
DESTINEES A LA VOIE INJECTABLE

THÈSE
PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLOME D'ÉTAT

Virginie FAYOLLE

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le : 25/09/2017

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury : Mr le Professeur Denis WOUESSIDJEW

Directrice de thèse : Mme Annabelle GEZE, Maitre de conférences

Membres :

Mme le Docteur Chloé VIDALIN

Mr Luc CHOISNARD, Maitre de conférences

L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Michel SEVE**

Vice-doyen et Directrice des Etudes : **Mme Christine DEMEILLIERS**

Année 2016-2017

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	LAPM - UMR CNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoit	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
PU	BAKRI	Aziz	TIMC-IMAG CNRS UMR 5525
ATER	BARDET	Jean-Didier	
MCU	BATANDIER	Cécile	LBFA - INSERM U1055
MCU-PH	BEDOUC	Pierrick	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	HP2 - INSERM U1042
MAST	BELLET	Béatrice	-
ATER	BOUCHERLE	Benjamin	DPM
DCE	BOULADE	Marine	SyMMES
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
DCE	BOURDIER	Guillaume	HP2
MCU	BOURGOIN	Sandrine	IAB - CRI INSERM UJF U823
DCE	BOUVET	Raphaël	HP2
MCU	BRETON	Jean	L.C.I.B. - UMR E3 CEA UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	HP2 - INSERM U1042
DCE	BROCCO	Benjamin	ILL
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	IBS - UMR 5075 CEA CNRS UJF
PU	BURMEISTER	Wim	UVHCI - UMI 3265 UJF EMBL CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoit	IAB - CRI INSERM UJF U823
Professeur émérite	CALOP	Jean	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	LAPM – UMR 5163 CNRS UJF
AHU	CHANOINE	Sébastien	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
MCU	CHOISNARD	Luc	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
AHU	CHOVELON	Benoit	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU-PH	CORNET	Murielle	THEREX – TIMC IMAG UMR 5525 CNRS UJF
DCE	COUCHET	Morgane	LBFA
PU-PH	DANEL	Vincent	SMUR SAMU
PU	DECOUT	Jean-Luc	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	DELETRAZ- DELPORTE	Martine	Equipe SIS -EAM 4128 UCB
MCU	DEMEILLIERS	Christine	LBFA - INSERM U1055
PU	DROUET	Christian	AGIM - CNRS 3405

Mise à jour le 03 nov.2016

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
PU	DROUET	Emmanuel	UVHCI - UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
MCU	DURMORT - MEUNIER	Claire	I.B.S – UMR 5075 CEA UJF CNRS
PU-PH	FAURE	Patrice	HP2- INSERM U1042
PRCE	FITE	Andrée	-
AHU	GARNAUD	Cécile	THEREX – TIMC IMAG UMR 5525 CNRS UJF
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	-
MCU-PH	GERMI	Raphaëlle	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	GILLY	Catherine	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	HP2- INSERM U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	-
Professeure émérite	GRILLOT	Renée	-
MCU	GROSSET	Catherine	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	GUIEU	Valérie	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
AHU	HENNEBIQUE	Aurélien	sous réserve de création de poste
MCU	HININGER-FAVIER	Isabelle	LBFA - Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	HP2- INSERM U1042
MCU	KHALEF	Nawel	TIMC-IMAG CNRS UMR 5525
MCU	KRIVOBOK	Serge	LCBM, IRTSV CEA
DCE	LE	Cong Anh Khanh	CERMAV
PU	LENORMAND	Jean Luc	THEREX, TIMC-IMAG
DCE	MARILLIER	Mathieu	HP2
PU	MARTIN	Donald	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF CNRS
AHU	MAZET	Roseline	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	L.E.C.A – UMR CNRS 5553
PU	MOINARD	Christophe	LBFA - Inserm U1055
DCE	MONTEMAGNO	Christopher	LRB
ATER	MORAND	Jessica	HP2
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	THEREX - TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCU	MOUHAMADOU	Bello	L.E.C.A – UMR CNRS 5553
DCE	MOULIN	Sophie	HP2
DCE	NADER	Serge	LCBM
DCE	NGUYEN	Kim-Anh	DPM
MCU	NICOLLE	Edwige	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	OUKACINE	Farid	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	PERES	Basile	DPM- UJF/CNRS UMR 5063
DCE	PERONNE	Lauralie	IAB
MCU	PEUCHMAUR	Marine	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	PEYRIN	Éric	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	RACHIDI	Walid	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF
MCU	RAVELET	Corinne	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	RIBUOT	Christophe	HP2- INSERM U1042

Mise à jour le 03 nov.2016

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
PAST	RIEU	Isabelle	-
Professeure émérite	ROUSSEL	Anne -Marie	-
PU-PH	SEVE	Michel	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	SOUARD	Florence	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
DCE	TAHER	Raleb	IBS
ATER	TAHMASEBI	Faezeh	TIMC-IM2AG
MCU	TARBOURIECH	Nicolas	UVHCI, UMR 3265 UJF-EMBL- CNRS
DCE	TODOROV	Zlatomir	BCI
PAST	TROUILLER	Patrice	-
DCE	VACHEZ	Yvan	CRI-GIN
MCU	VANHAVERBEKE	Cécile	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
DCE	VERNET	Céline	CRI-IAB
DCE	VRAGNIAU	Charles	UVHCI
PU	WOUESSIDJEWE	Denis	DPM –UMR 5063 UJF CNRS

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIB : Centre d'Innovation en Biologie

CRI : Centre de Recherche INSERM

CNRS : Centre National de Recherche Scientifique

DCE : Doctorants Contractuels Enseignement

DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire et de Cognition et Ontogenèse »

HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

IAB : Institut Albert Bonniot,

IBS : Institut de Biologie Structurale

JR : Jean Roget

LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes

LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux

LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine

LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques

MCU : Maitre de Conférences des Universités

MCU-PH : Maitre de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers

PAST : Professeur Associé à Temps Partiel

PRAG : Professeur Agrégé

PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement

PU : Professeur des Universités

PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers

TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation

UMR: Unité Mixte de Recherche

UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 03 nov.2016

A Laurence, sœur trop peu connue mais qui est partie trop jeune. Puisses les progrès médicaux éradiquer toutes les maladies du monde.

Remerciements

A Mr le Professeur Denis Wouessidjewe, pour avoir accepté d'être le président du jury. Je le remercie de sa bienveillance et lui témoigne mon respect.

A ma Directrice de thèse, Mme Annabelle Geze, qui a cru en mon travail et m'a soutenu jusqu'à la fin. Elle fut ma tutrice universitaire dans le cadre de mon premier stage industriel de quatrième année. J'ai également beaucoup apprécié travailler à ses côtés lors du projet médicament de cinquième année. Je n'en suis que plus honorée qu'elle ait acceptée d'être ma Directrice de thèse lorsque je lui ai proposée mon sujet.

Je tiens également à remercier Mme Chloé Vidalin, qui m'a épaulé lors de mon apprentissage chez Bertin Pharma. Merci pour son intérêt pour ma thèse et pour son amitié. Je suis très heureuse que Mme Vidalin, Docteur en pharmacie, ait accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je veux également remercier Mr Luc Choisnard, Maître de conférences universitaire, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

A ma maman, Mme Catherine Ganivet, sans qui je n'aurais jamais été pharmacien. Merci pour son soutien incommensurable. A ma mamie, Mme Hélène Ganivet, pour son soutien moral et sa patience à toute épreuve.

Je tiens également à remercier mes amis, dont certains ont fait le déplacement de très loin pour assister à ma soutenance de thèse, Mme Lise Pelamatti, Mr Bastien Magnaldi, Mme Mai An Pham, Mme Cyrielle Farquier et Mr Pascal Aragona.

Je remercie particulièrement mon compagnon, Mr Félix Benizé, mon coco de Pâques, pour sa présence et son soutien moral. Je n'aurais sans doute pas eu la force de faire tout ce que j'ai entrepris sans lui.

Pour terminer, je tenais à remercier mes collègues, tout d'abord ceux de Bertin Pharma, entreprise dans laquelle j'ai effectué mon apprentissage. Ils m'ont encouragé pour mes premières recherches et ont apporté leur aide sur les essais effectués. Mes remerciements vont

aussi à mes collègues de Pathéon, mon entreprise actuelle, pour leur soutien inconditionnel et leur entêtement à me voir soutenir ma thèse.

Table des matières

PROBLEMATIQUES DE FORMULATIONS DE PROTEINES THERAPEUTIQUES DESTINEES A LA VOIE INJECTABLE	1
Table des matières	10
I. Introduction.....	17
II. Définitions et généralités	19
II.1. Définitions	19
II.1.1. Le médicament	19
II.1.2. Les biotechnologies	19
II.1.3. Le biomédicament	19
II.2. Les protéines et peptides thérapeutiques	22
II.2.1. Point sur les acides aminés.....	22
II.2.2. Les différentes structures d'une protéine.....	24
II.2.3. Les peptides thérapeutiques	25
II.2.4. Production de protéines et peptides thérapeutiques	26
II.3. Bio médicaments : Réglementation en vigueur	30
II.3.1. Bioproduction des protéines et peptides thérapeutiques	30
II.3.2. Mise sur le marché d'un biomédicament au sein de l'Union Européenne	30
II.3.3. Réglementation en vigueur aux USA et au Japon	31
II.4. Contexte et économie	32
III. Problématiques de stabilité des protéines et peptides thérapeutiques : Les enjeux de la microencapsulation	35
III.1. Les problématiques de stabilité	36
III.1.1. Instabilités physiques	37
III.1.2. Instabilités chimiques.....	39
III.2. La stabilité d'une protéine : un phénomène multifactoriel	40
III.2.1. Les enjeux de la formulation	40
III.2.2. Les enjeux du procédé de production et du conditionnement primaire	46
III.3. Formulations innovantes de protéines pour la voie injectable : Cas des suspensions microparticulaires injectables	48
III.3.1. Les différentes approches disponibles	49
IV. Essais de micro encapsulation de protéines thérapeutiques dans des PLGA : Technique de l'évaporation de solvant basé sur la double émulsion e/h/e.....	59
IV.1. Introduction de l'étude	59
IV.2. Matériels et méthodes	60

IV.2.1. Matières premières	60
IV.2.2. Méthodologie	61
IV.3. Résultats	72
IV.3.1. Résultats des essais préliminaires	72
IV.4. Discussion et conclusion sur le plan d'expériences réalisé	86
V. Conclusion générale	91
REFERENCES	93
ANNEXE 1 : Les biomédicaments disponibles sur le marché français	99
ANNEXE 2 : Les méthodes analytiques rencontrées en biotechnologie	104
Les analyses chromatographiques	104
L'électrophorèse.....	105
La spectroscopie	106
ANNEXE 3 : Biomédicaments formulés avec des microsphères de PLGA - Exemples.....	108
ANNEXE 4 : Essais de microencapsulation placebo dans des PLGA - Les résultats d'analyse en MEB et granulométrie laser	110

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les 21 AA codés génétiquement chez l'être humain.....	23
Tableau 2 : Les différents niveaux d'organisation d'une protéine [17].....	25
Tableau 3 : Intérêts et inconvénients du médicament protéique.....	35
Tableau 4 : Principaux excipients pharmaceutiques destinés dans la formulation de solutions de protéines thérapeutiques (incluant les solutés de reconstitution).....	44
Tableau 5 : Principaux excipients pharmaceutiques destinés dans la formulation de lyophilisats de protéines thérapeutiques [40]	45
Tableau 6 : Matériaux impliqués, <i>leachables</i> et <i>extractables</i>	47
Tableau 7 : Les différents polymères utilisés dans le milieu pharmaceutique [61]	53
Tableau 8 : Principaux procédés de production de microsphères de PLGA [61]	55
Tableau 9 : Techniques de production de microparticules de PLGA [58] [61].....	57
Tableau 10 : Matières.....	60
Tableau 11 : Viscosités et masses moléculaires du PVP et du PVA.....	60
Tableau 12 : Matériels.....	64
Tableau 13 : Résumé des lots fabriqués lors des essais préliminaires.....	66
Tableau 14: Paramètres de lyophilisation utilisés pour les essais 1 et 2	67
Tableau 15 : Paramètres de lyophilisation utilisés pour l'essai 3 et retenus pour le plan d'expériences	67
Tableau 16 : Plan d'expériences : Domaine expérimental	68
Tableau 17 : Plan d'expériences : Les formules sélectionnées	70
Tableau 18 : Lots D160185 et D160186 avant et après l'évaporation du solvant	72
Tableau 19 : Revue de la littérature : l'émulsion primaire.....	73
Tableau 20 : Rendement des lots D160138/A, B et C	74
Tableau 21 : Résultats des analyses en MEB et granulométrie laser.....	78
Tableau 22 : Lecture des résultats du plan d'expériences	78
Tableau 23 : Résultats remise en suspension - Analyse de granulométrie en voie humide	81
Tableau 24 : Excipients retenus pour avoir une plus petite taille de microsphères	86
Tableau 25 : Excipients retenus pour avoir une meilleure homogénéité de taille de microsphères ...	86
Tableau 26 : Excipients retenus pour avoir des microsphères ayant une surface lisse et sans pores..	86
Tableau 27 : Rang d'absorption des différentes parties d'une protéine.....	106

Liste des figures

Figure 1 : Structure et organisation des Anticorps monoclonaux [12]	21
Figure 2 : La liaison peptidique [15]	22
Figure 3 : Structure générale d'un acide alpha aminé	22
Figure 4 : Processus de développement d'une nouvelle substance active	26
Figure 5 : Classification pharmacologique des 173 biomédicaments commercialisés en France en 2014, Source : Leem	32
Figure 6 : Classification ATC de niveau 1 des biomédicaments commercialisés en France en 2014, Source : Leem	33
Figure 7 : Instabilités des protéines et peptides	36
Figure 8 : Les différents systèmes de délivrance micro-particulaires et colloïdaux [56]	49
Figure 9 : Classification des liposomes selon leur taille et le nombre de bicouches [57]	50
Figure 10 : Structure chimique d'un PLGA et de ses monomères [62]	54
Figure 11 : Mécanisme de libération du PA à partir de microsphère, Figure tirée de la revue [55].	54
Figure 12 : Technique de l'évaporation de solvant basé sur la formation d'une double émulsion e/h/e	61
Figure 13 : Préparation des phases	62
Figure 14 : D (v;0.5), D (v;0.9) et D (v;0.1)	69
Figure 15 : Plan d'expériences : Diagramme de Gant	71
Figure 16 : Lots D160138/A,B et C après évaporation de solvant.....	74
Figure 17: Microscopie optique des lots D160138/A et C, grossissement x20	75
Figure 18 : Images en microscopie électronique à balayage du lot D16179.....	76
Figure 19 : Répartition granulométrique du lot D160179. US = Ultrasons, US – rest = repos d'une minute après sonication	77
Figure 20 : Réponse 1 : Le diamètre médian des microparticules avant ultrasons : D (v;0.5)	79
Figure 21 : Réponse 2 : Le diamètre médian des microparticules pendant les ultrasons : D (v;0.5)	80
Figure 22 : Réponse 3 : L'étalement de la répartition granulométrique avant ultrasons : D (v;0.9) - D (v;0.1).....	80
Figure 23 : Réponse 4 : L'étalement de la répartition granulométrique pendant les ultrasons : D (v;0.9) - D (v;0.1).....	81
Figure 24 : Réponse 5 : La morphologie des microparticules	82
Figure 25 : Exemples d'images de microsphères en MEB, à gauche : lot D160208 ; à droite : lot D160209	85
Figure 26 : Le focus isoélectrique (image extraite du site internet www.nationaldiagnostics.com , consulté le 11/05/2016)	105
Figure 27 : Le dichroïsme cellulaire, image extraite du site internet du CNRS d'Orléans [29]	107

Liste des abréviations

AA : Acide aminé

Ac : Anticorps

Acm : Anticorps monoclonal

AMM : autorisation de mise sur le marché

ARN : Acide ribonucléique

BPF : Bonnes pratiques de Fabrication

Da : Daltons

DC : Dichroïsme circulaire

DCI : Dénomination commune internationale

DTPA : Acide diéthylène triamine penta acétique

EDTA : Acide Ethylène diamine tétraacétique

g : Gramme

GMP : Good Manufacturing Practices

GnRH : Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires

HLB : Balance hydrophile/lipophile

ICH : International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

IM : Intramusculaire

IV : Intraveineux

Leem : Les entreprises du médicament

MM : Masse molaire

MEB : Microscopie électronique à balayage

mg : Milligramme

mL : Millilitre

MWNTs : *Multi-walled nanotubes* (nanotubes à multiples parois)

m/v : Rapport masse/volume

NaCl : Chlorure de sodium

NB : Nota Bene

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PA : Principe actif

PAtm : Pression atmosphérique

PEG : Polyethylene glycol

pI : Point isoélectrique

PLGA : Poly(lactic-co-glycolic acid) – Poly acides lactiques et glycolique

PVA : Polyvinyl alcohol - Polyalcool vinylique

PVP : Polyvinyl pyrrolidone

Rpm : Rotations par minute

SC : Sous-cutané(e)

SWNTs : *Single-walled nanotubes* (nanotubes à simple paroi)

UV : Ultra-violet

I. Introduction

Depuis plusieurs décennies, les médicaments issus de la synthèse chimique ont permis de faire face à de nombreuses pathologies. Cependant, certaines situations pathologiques moins maîtrisées voir moins couvertes, telles que certains types de cancers et les maladies neurodégénératives, justifient la recherche de nouveaux principes actifs obtenus par des voies innovantes. Éléments essentiels à la vie, les peptides et protéines assurent chez l'homme des fonctions physiologiques nombreuses. En tant que principes actifs, ils peuvent restaurer, corriger ou modifier ces fonctions lorsqu'elles font défaut chez l'individu malade. Pour donner un exemple, le diabète, pathologie qui se caractérise par une insuffisance en insuline, protéine physiologiquement produite par le pancréas d'un individu sain, peut être stabilisé par l'injection répétée de cette protéine déficiente chez le malade. Les peptides et protéines thérapeutiques suscitent donc particulièrement l'attention tant ils répondent aux besoins évoqués précédemment.

Les biotechnologies permettent d'utiliser le vivant, comme par exemple des bactéries ou des levures, afin de produire des médicaments appelés biomédicaments capables de traiter des maladies diverses et variées. Les protéines thérapeutiques constituent une des catégories de principes actifs produites par cette voie. De taille plus petite et moins complexes les peptides peuvent être synthétisés chimiquement. L'élaboration de peptides et protéines thérapeutiques est extrêmement compliquée car ce sont des molécules fragilisées à la moindre perturbation de leur environnement. La voie orale ajoutant des facteurs d'instabilité supplémentaires tels que l'acidité et la présence d'enzymes dans l'estomac, la voie injectable est la voie privilégiée pour leur administration. Cependant, produire et formuler une protéine même destinée à la voie injectable relève du véritable défi tant elle peut se révéler particulièrement instable.

Les pathologies ciblées par ces protéines thérapeutiques sont essentiellement chroniques et donc nécessitent un traitement au long cours. Or, les peptides et protéines, une fois injectés, sont rapidement éliminés par les différents mécanismes de défense et d'épuration du corps humain. Cela veut dire que la durée de vie d'une protéine ou d'un peptide en circulation est limitée. Une administration répétée et périodique du produit est donc nécessaire, augmentant l'inconfort du patient car l'injection est une méthode invasive douloureuse.

Le cheminement de cette thèse découle des deux points précédents. Après avoir introduit les peptides et protéines thérapeutiques, leur définition et leurs méthodes d'obtention, et replacé les protéines recombinantes et les peptides synthétiques dans leur contexte économique et réglementaire, nous aborderons les problématiques de stabilité des protéines thérapeutiques destinées à la voie injectable ainsi que les solutions apportées en terme de procédé de fabrication, de formulation et de contrôle. Un chapitre expérimental développe également les microsphères et leur intérêt dans la libération prolongée de protéines thérapeutiques dans le corps humain, permettant un espacement de l'intervalle entre deux administrations chez le patient. Les expériences effectuées ont en effet mené à la maîtrise du procédé de microencapsulation à travers la technique de l'évaporation de solvant basée sur la double émulsion. Pour terminer, une discussion sera engagée sur ce procédé et sur la stabilité de la protéine encapsulée.

Cette thèse insiste sur le fait que l'intégralité du développement du médicament contenant des peptides ou protéines thérapeutiques doit être centré sur la parfaite stabilité du principe actif, c'est-à-dire ici la protéine ou le peptide thérapeutique, et le maintien de son activité jusqu'à l'atteinte de sa cible, garantissant ainsi sa qualité, sa sécurité et son efficacité.

II. Définitions et généralités

Après avoir défini les peptides et protéines thérapeutiques et leurs méthodes d'obtention, ce premier chapitre introductif permettra de les replacer dans leur contexte économique. Il sera complété de figures qui illustreront la place dominante de ces molécules sur le marché français et international. La forte demande de thérapies innovantes est telle qu'elle justifie les nombreuses études récentes parues sur les peptides et les protéines thérapeutiques, tentant majoritairement de résoudre leurs problèmes de stabilité. Ce premier paragraphe permettra également de faire la distinction entre un peptide synthétique, actif thérapeutique dont le produit final est un médicament, et une protéine recombinante, actif thérapeutique dont le produit final est appelé biomédicament. L'un comme l'autre font partie des molécules thérapeutiques d'avenir [1].

II.1. Définitions

II.1.1. Le médicament

Le médicament est défini comme « *toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique* » [2], [3].

II.1.2. Les biotechnologies

La biotechnologie est « *l'application de la science et de la technologie à des organismes vivants, de même qu'à ses composantes, produits et modélisations, pour modifier des matériaux vivants ou non-vivants aux fins de la production de connaissances, de biens et de services* » [4].

Cette thèse traitera des biotechnologies rouges qui sont les biotechnologies appliquées à la santé.

En 1928, Alexander Fleming est le premier homme à appliquer les biotechnologies en santé à travers la découverte de la pénicilline, substance produite par une moisissure *Penicillium* [5].

II.1.3. Le biomédicament

Un biomédicament est « *tout médicament dont la substance 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* » [6].

Les biomédicaments au sens strict du terme ont donc la caractéristique d'être produits à partir d'organismes vivants ou de leurs composants cellulaires. Les biomédicaments sont une classe de médicaments hétérogènes et complexes. Selon la substance active, les procédés de fabrication, allant de la synthèse au conditionnement, seront différents de même que les survenues d'instabilités seront nombreuses. Leur coût de production est par conséquent bien supérieur à celui des médicaments issus de la synthèse chimique.

« *Un médicament biosimilaire est similaire à un médicament biologique de référence qui a été autorisé depuis plus de 8 ans et dont le brevet est, de ce fait, tombé dans le domaine public. Les médicaments*

biosimilaires ne peuvent toutefois pas être comparés aux médicaments génériques (copies de médicaments issus de la synthèse chimique) : les matières premières utilisées, les procédés de production, les modes d'action, les procédures d'autorisation de mise sur le marché... sont différents. Alors que les réactions chimiques sont reproductibles et prévisibles, les réactions biologiques aboutissent à des produits qui doivent être étroitement contrôlés afin de garantir une similarité entre le médicament biosimilaire et son biomédicament de référence » [7].

Un classement des biomédicaments est donné par le Leem, qui les divise en 3 catégories [8] :

- **Les vaccins**

Les vaccins peuvent être thérapeutiques ou prophylactiques. Ils ont pour rôle de stimuler le système immunitaire et ainsi protéger l'individu d'une maladie. L'antigène est la partie du vaccin qui « mime » la maladie à prévenir. Il provient du pathogène (virus, bactérie ou parasite) qui cause la maladie [9], [10].

Les vaccins peuvent avoir une forme finale liquide ou lyophilisée, à destination de la voie injectable. Le développement de la formulation d'un vaccin doit avoir pour but premier de générer de la part de l'organisme une forte immunogénicité à l'antigène administré. C'est pour cela que certaines formulations de vaccins, notamment celles qui utilisent des souches inactives du pathogène, utilisent des adjuvants afin de stimuler la réaction immunitaire.

Du fait de la présence dans le vaccin d'organismes ou de parties d'organismes microbiologiques, des précautions sont à prévoir en termes d'innocuité, de stérilité, de sécurité et de stabilité aux conditions normales de stockage [11].

- **Les anticorps monoclonaux (Acm)**

Les Acm sont des molécules d'immunoglobulines (Ig) ayant une séquence spécifique d'acides aminés qui leur permet d'interagir spécifiquement avec un épitope donné, présent sur un ou une famille d'antigènes (Ag).

La Figure 1 représente la structure d'un Acm. Les Acm sont dit « bivalents » car ils peuvent se lier à deux Ag. Ils possèdent deux chaînes lourdes (H) et deux chaînes légères (L). La région Fab (*Fragment antigen bonding*) contient le paratope responsable de la fixation à l'antigène. Plus précisément ; le paratope est situé aux extrémités de l'Ac, au niveau des domaines VH et VL, parties variables des chaînes lourdes et légères. La spécificité d'interaction opère à ce niveau, plus particulièrement aux six régions hypervariables localisées aux extrémités et appelées CDR (« *complementarity determining regions* »).

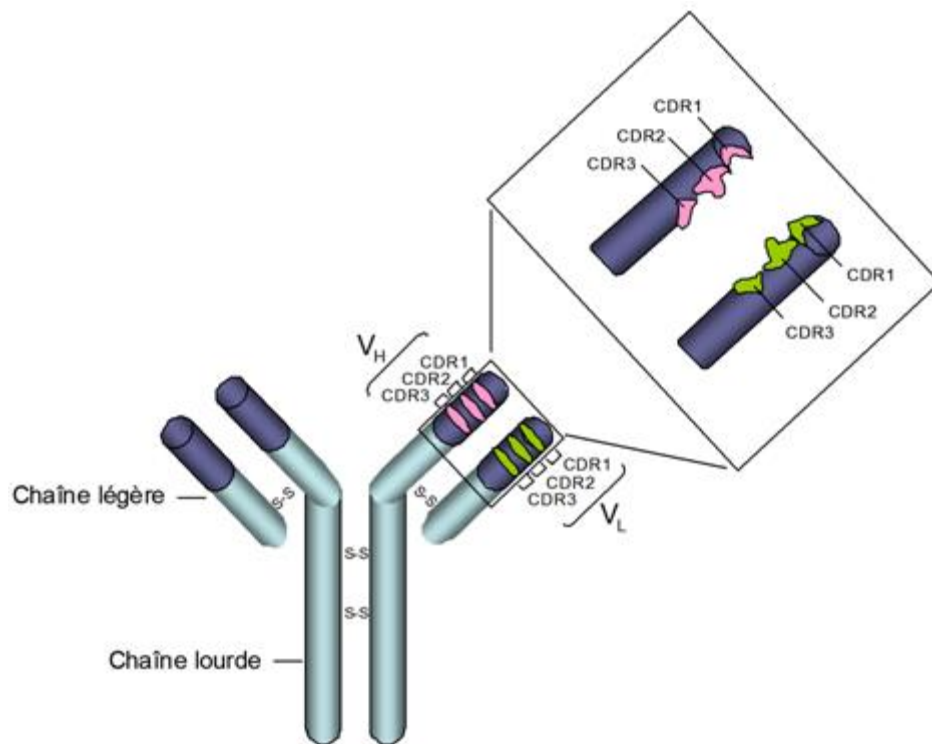


Figure 1 : Structure et organisation des Anticorps monoclonaux [12]

- Les protéines thérapeutiques

Les protéines thérapeutiques incluent : les facteurs de croissance, les hormones, les cytokines, les protéines de fusion, les facteurs plasmatiques et les enzymes.

Les protéines synthétisées par notre organisme sont des biopolymères appelés polypeptides d'acides aminés de la série L. Elles sont constituées d'une suite d'AA liés entre eux par une liaison peptidique (liaison covalente entre un atome de carbone et un atome d'azote de 2 AA consécutifs, voir Figure 2). Les AA faisant partie d'une chaîne polypeptidique sont appelés résidus.

II.2. Les protéines et peptides thérapeutiques

Les protéines sont produites naturellement à l'intérieur de nos cellules via les processus de transcription et de traduction. Lorsque moins de 10 AA constituent la séquence peptidique, nous parlerons de peptide. Une protéine par définition sera un polypeptide, contenant dans sa séquence plus de 10 AA [13]. De même ici nous conviendrons qu'un peptide a une masse moléculaire inférieure à 5000 Da alors qu'une protéine a une masse moléculaire supérieure à ce chiffre [14]. De ce fait l'insuline est l'une des plus petites protéines disponibles sur le marché, avec une masse moléculaire de 5800 Da.

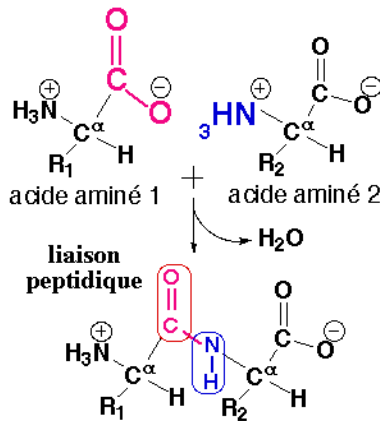


Figure 2 : La liaison peptidique [15]

Il semble important de bien comprendre la structure d'une protéine afin de saisir par la suite les mécanismes conduisant à son instabilité.

II.2.1. Point sur les acides aminés

21 acides α aminés différents sont répertoriés comme participant à la structure d'une protéine. La structure générale d'un AA est donnée dans la Figure 3, seul le radical R variant d'un AA à l'autre. Tous les AA sont des molécules chirales (présence d'un carbone asymétrique) à l'exception de la glycine (R = H). Les AA ont donc deux énantiomères, l'un de la série D l'autre de la série L. Les AA de la série L sont ceux présents naturellement dans les molécules du vivant. Chaque molécule d'AA est représentée dans le tableau 1.

L'homme a ainsi besoin de ces 21 AA mais il n'est pas capable de tous les synthétiser. Les AA dits « essentiels » doivent ainsi être retrouvés dans l'alimentation chez l'homme à défaut d'être synthétisés par l'organisme, ou à une vitesse insuffisante. Le Tableau 1 résume ces 21 acides aminés en indiquant leur radical R, leur charge, leurs particularités et s'ils sont essentiels ou non.

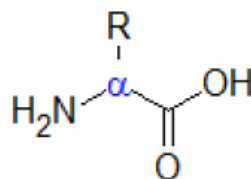


Figure 3 : Structure générale d'un acide alpha aminé

NOM	CODE A 3 LETTRES	CODE A UNE LETTRE	RADICAL R	CHARGE	COMMENTAIRE	ESSENTIEL
ALANINE	Ala	A	CH ₃ (méthyle)	Non polaire (chaîne latérale aliphatique)	/	Non
ARGININE	Arg	R	C ₄ H ₁₁ N ₃ (groupement guanidinium)	Chaîne latérale chargée positivement	/	Oui
ACIDE ASPARTIQUE	Asp	D	C ₂ H ₂ O ₂	Chaîne latérale chargée négativement	/	Non
ASPARAGINE	Asn	N	C ₂ H ₄ NO (amide)	AA polaire mais non chargé	Site de réaction d'oxydo réduction. Forme des ponts disulfures	Non
CYSTEINE	Cys	C	CH ₃ S (sulfhydryle)	AA polaire mais non chargé		Non
ACIDE GLUTAMIQUE	Glu	E	C ₃ H ₄ O ₂	Chaîne latérale chargée négativement	/	Non
GLUTAMINE	Gln	Q	C ₃ H ₆ NO (amide)	AA polaire mais non chargé	/	Non
GLYCINE	Gly	G	H (hydrogène)	Chaîne latérale aliphatique (AA non polaire)	/	Non
HISTIDINE	His	H	C ₄ H ₆ N ₂ (imidazole)	Chaîne latérale chargée positivement	/	Oui
ISOLEUCINE	Ile	I	C ₄ H ₉ (isobutyle)	Chaîne latérale aliphatique (AA non polaire)	/	Oui
LEUCINE	Leu	L	C ₄ H ₉ (isobutyle)	Chaîne latérale aliphatique (AA non polaire)	/	Oui
LYSINE	Lys	K	C ₄ H ₁₁ N (amine)	Chaîne latérale chargée positivement	/	Oui
METHIONINE	Met	M	C ₃ H ₇ S (thioéther)	Chaîne latérale non polaire	Premier AA dans la synthèse protéique	Oui
PHENYLALANINE	Phe	F	C ₇ H ₇ (phényl)	Chaîne latérale aromatique	/	Oui
PROLINE	Pro	P	C ₃ H ₆ (pyrrolidine)	Chaîne latérale cyclique (AA polaire mais non chargé)	/	Non
SELENOCYSTEINE	Sec	U	CH ₃ Se	Chaîne latérale chargée négativement	/	
SERINE	Ser	S	CH ₃ O (hydroxyle)	AA polaire mais non chargé	Site de phosphorylation	Non
THREONINE	Thr	T	C ₂ H ₅ O (hydroxyle)	AA polaire mais non chargé	Site de phosphorylation	Oui
TRYPTOPHANE	Trp	W	C ₉ H ₈ N (indol)	Chaîne latérale aromatique	/	Oui
TYROSINE	Tyr	Y	C ₇ H ₇ O (phénol)	Chaîne latérale aromatique	Site de phosphorylation	Non
VALINE	Val	V	C ₃ H ₇ (isopropyle)	Chaîne latérale aliphatique (AA non polaire)	/	Oui

Tableau 1 : Les 21 AA codés génétiquement chez l'être humain

II.2.2. Les différentes structures d'une protéine

La structure primaire :

La structure primaire de la protéine correspond à la séquence en résidus d'AA dans la chaîne polypeptidique. Par convention, on désigne le premier acide aminé de la chaîne comme étant celui dont le groupement aminé reste libre. Cette extrémité sera ainsi nommée 5' ou N-terminale. On désigne comme étant le dernier résidu de la chaîne celui dont le groupement carboxylique reste libre. Cette extrémité sera quant à elle nommée 3' ou C-terminale.

La structure secondaire :

Certaines parties de la protéine se replient de manière répétitive. Deux structures principales sont retrouvées :

- L'hélice α correspond au repliement hélicoïdal périodique. Les interactions mises en jeu sont des liaisons hydrogène. Les chaînes latérales sont orientées vers l'extérieur.
- Le feuillet β correspond quant à lui au repliement parallèle ou antiparallèle avec formation d'un feuillet plan plissé. Les interactions mises en jeu sont des liaisons hydrogène.

La structure tertiaire :

La structure tertiaire de la protéine est le repliement de sa chaîne polypeptidique dans l'espace. La protéine adopte une structure tridimensionnelle dépendante de sa structure primaire et de son environnement.

Les interactions mises en jeu sont multiples (interactions de Van der Waals, électrostatiques, covalentes mais aussi des interactions entre certaines parties de la protéine et le solvant dans lequel elle est immergée ainsi que les ions et autres composés présents dans l'environnement de celle-ci. Une protéine hydrophile aura typiquement besoin d'un environnement aqueux pour développer sa structure tridimensionnelle.

La structure tertiaire de la protéine est déterminante pour sa fonction. La présence d'agent dénaturant met en péril cette structure.

La structure quaternaire :

Il est possible que plusieurs chaînes polypeptidiques (2 ou plus) s'associent entre elles pour former une structure quaternaire. Les interactions mises en jeu sont multiples, covalentes ou non.

Le tableau 2 résume les 4 niveaux d'organisation d'une protéine.

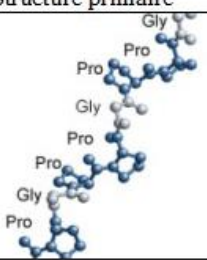
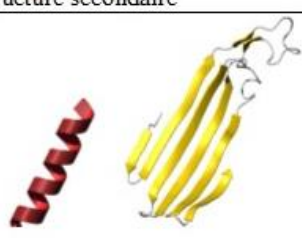
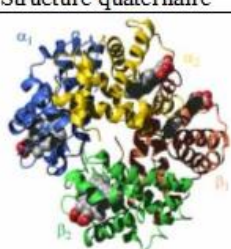
Structure primaire	Structure secondaire	Structure tertiaire	Structure quaternaire
			
Séquence en acides aminés (AA) AA > 10 : protéine AA < 10 : peptide	Repliement local de la chaîne d'acides aminés et stabilisation par des liaisons hydrogène. 2 structures principales : hélices alpha et feuillets bêta	Repliement de la chaîne polypeptidique dans l'espace. Une perte de la structure entraîne une perte de la fonction de la protéine	Assemblage de 2 ou plusieurs chaînes polypeptidiques : complexe fonctionnel

Tableau 2 : Les différents niveaux d'organisation d'une protéine [17]

L'obtention de protéines recombinantes thérapeutiques permet de créer des biomédicaments traitant des maladies diverses et variées telles que le diabète ou l'hémophilie.

On distingue les protéines solubles et les protéines membranaires. Ces dernières représentent environ 30% des protéines totales de l'organisme et sont ciblées par près de 40% des médicaments [5].

II.2.3. Les peptides thérapeutiques

Les peptides naturels ou bioactifs sont des fragments d'une protéine. Ce sont des molécules de signalisation ayant pour rôles la régulation des fonctions physiologiques et la défense immunitaire dans le corps humain [5]. Certains peptides thérapeutiques sont appelés à ce titre peptides antimicrobiens ou PAM, agissant sur la réponse immunitaire innée.

La découverte de ces peptides bioactifs date de 1962, avec la bombinine isolée de la peau d'un crapaud sonneur à ventre jaune.

Ces peptides, de petite taille, peuvent être injectés par voie IV, SC ou IM comme c'est le cas pour la calcitonine, peptide thérapeutique utilisé en prévention de la perte osseuse [18].

II.2.4. Production de protéines et peptides thérapeutiques

Les cellules ou fractions de tissus humains dans leur état physiologique sont comparés avec leur état pathologique par une étude qualitative et quantitative de leur transcriptome (Ensemble des ARN originaires de la transcription du génome) ou de leur protéome (Ensemble des protéines d'une cellule). Si une différence est trouvée dans l'expression de gènes entre ces deux états, alors un médicament pourrait corriger ce défaut d'expression. C'est comme cela que des potentielles cibles thérapeutiques sont recherchées puis validées par génomique fonctionnelle. Des souris transgéniques sont utilisées à cet effet. Le principe de la génomique fonctionnelle est d'évaluer l'impact physiopathologique d'une surexpression ou d'une extinction du gène.

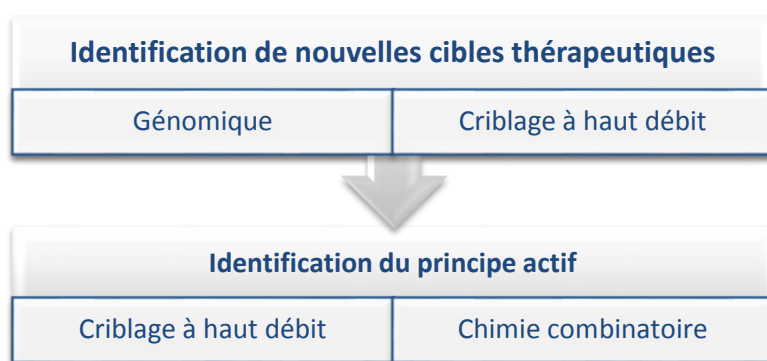


Figure 4 : Processus de développement d'une nouvelle substance active

A partir d'une nouvelle cible thérapeutique identifiée, un criblage à haut débit est réalisé afin d'obtenir plusieurs molécules candidates, testées et optimisées sur de nouveaux modèles animaux.

Historiquement, les protéines étaient extraites directement à partir de tissus animaux ou végétaux ou fabriquées par héli-synthèse pour les petites molécules. Les problèmes de ces méthodes étaient multiples. Premièrement, plusieurs crises sanitaires sont apparues. Citons le cas de la maladie de Creutzfeld-Jacob accidentellement survenue après l'administration chez des patients de l'hormone de croissance hGH extraite de l'hypophyse. Par ailleurs, le risque de contamination, les coûts de production élevés, faible rendement, et une héli-synthèse complexe s'ajoutent aux problèmes rencontrés avec cette méthode.

Une autre technique de production de protéines thérapeutiques est alors apparue, apportant une alternative aux méthodes d'extraction. Il s'agit de la technologie de l'ADN recombinant. La technique de recombinaison génétique est aujourd'hui l'une des plus utilisées pour produire les protéines thérapeutiques.

II.2.4.1. La technologie de l'ADN recombinant

Apparue dans les années 1970, cette technologie consiste à localiser, isoler et amplifier un gène d'intérêt. Celui-ci est ensuite introduit et exprimé dans un micro-organisme hôte (bactéries, levures, cellules animales etc...) [19].

La première protéine recombinante thérapeutique a été l'insuline, mise sur le marché par Lilly en 1982 sous le nom commercial Humalog®.

Tous ces systèmes hôtes possèdent leurs avantages et leurs inconvénients [5]. Le choix du système d'expression dépendra principalement de la protéine à faire exprimer et de ses propriétés intrinsèques. Le couple système hôte / vecteur d'expression ainsi que le système de purification dépendront également de la quantité et la fréquence à produire ainsi que de son application, qu'elle soit pour la recherche ou pour une administration chez l'homme. Les protéines solubles sont les plus faciles à produire par un plus grand nombre de cellules hôte, contrairement aux protéines membranaires qui sont de nature hydrophobe [5].

Globalement, l'utilisation de cellules procaryotes en tant que cellules hôtes propose un faible coût de production. C'est un procédé simple avec une production de masse rapide. Cependant, la protéine ne subit pas de modifications post-traductionnelles car les bactéries n'ont pas cette fonction. Cela peut être source d'une inactivation de la protéine si ces modifications sont essentielles à l'activité biologique de la protéine. Les microbes les plus utilisés dans la bioproduction de protéines recombinantes sont les bactéries *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas fluorescens* [5]. De récentes avancées technologiques ont permis à certaines souches modifiées de la bactérie *Escherichia coli* de réaliser ces modifications post-traductionnelles, propres aux organismes eucaryotes [20]. Les organismes procaryotes produisent essentiellement les protéines recombinantes dans leur cytoplasme.

L'utilisation de levures comme organismes hôtes permet la synthèse de protéines recombinantes complexes. Les levures sont des cellules eucaryotes unicellulaires. Elles sont un bon compromis entre les bactéries et les cellules de mammifères. En effet, les protéines recombinantes peuvent être produites en masse et à un haut degré de spécificité. Les levures les plus utilisées dans la bioproduction de protéines recombinantes sont *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris* [5].

L'utilisation de cellules de mammifères comme organismes hôtes est optée lorsque la protéine à produire est complexe. La méthode d'expression transitoire ou TGE est un procédé de production permettant une synthèse robuste des protéines [5]. Les cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*), les cellules HEK293 (*E1-transformed human embryonal kidney/neuronal cells*) ainsi que les cellules PER.C6 (*E1-transformed human embryonal retin cells*) sont les plus utilisées dans la bioproduction de protéines recombinantes [5]. Ces cellules permettent de produire une protéine de haute qualité, mais les coûts de production sont élevés.

A titre d'information, il existe d'autres systèmes hôtes utilisés dans la production de protéines recombinantes. Les protéines peuvent en effet être exprimées par les cellules d'insectes, les cellules de plantes, dans un système acellulaire ou bien chez des animaux transgéniques.

Lorsque la protéine d'intérêt est produite à l'échelle industrielle dans un bioréacteur, on parle de phase en amont du procédé [21].

Une banque cellulaire à deux niveaux, conservant les clones génétiquement modifiés, peut être utilisée par l'industriel. Un échantillon cellulaire est puisé dans la WCB (*Working cell bank*), constituée à partir d'une MCB (*Master cell bank*). Cet échantillon est ensuite amplifié afin de permettre l'inoculation dans le bioréacteur où les cellules sont dans des conditions optimales pour produire la protéine d'intérêt.

Le mélange obtenu subit une clarification primaire ou extraction. En d'autres termes, la protéine d'intérêt est séparée des cellules et des déchets.

La phase de purification de la protéine d'intérêt est appelée phase en aval du processus. Elle consiste la plupart du temps à réaliser de multiples opérations de chromatographies puis de filtrations pour que le taux final d'impuretés soit le plus faible possible.

L'effet de « *salting out* » est également exploité lors de la purification d'une protéine de par leur précipitation avec un anion phosphate ou un cation ammonium (exemple : le sulfate d'ammonium). En effet, lorsque la concentration en sel est suffisamment élevée pour priver la protéine des molécules d'eau qui l'hydratent, celle-ci est désolvatée et précipite [22].

La protéine hautement purifiée est généralement en solution. Une fois produites et purifiées, les protéines sont stockées et transportées dans un milieu aqueux favorisant leur stabilité. Ce milieu aqueux est très important à prendre en compte en vue du développement de la formulation. En effet, il est essentiel d'ajuster la formulation finale à partir de la solution initiale afin d'obtenir les conditions optimales de stabilité de la protéine à formuler.

Les protéines sont dans un dernier temps congelées ou conservées au froid avant leur mise en forme pharmaceutique.

Les peptides bioactifs sont issus des protéines appelées pré-pro-protéines ou pré-pro-peptides, inactifs dans un premier temps, puis transformés grâce à l'action d'enzymes spécifiques [5].

II.2.4.2. La synthèse chimique

Pour les peptides, de tailles moins importantes, une dernière méthode de synthèse a été développée à partir des années 60. Il s'agit de synthétiser chimiquement les peptides, les protéines solubles ou encore les protéines membranaires, sur support solide ou bien en phase liquide [23]. Cette technique est devenue une alternative notable à la bioproduction des peptides thérapeutiques. Elle est par ailleurs utilisée en complément de méthodes biotechnologiques [5].

L'ocytocine est le premier peptide thérapeutique synthétique à avoir été utilisé chez l'homme.

La synthèse chimique de peptides est possible grâce au couplage du groupe carboxyle d'un acide aminé avec le groupe amine de l'acide aminé qui suit dans la chaîne, via un agent de déshydratation. Cette synthèse chimique a lieu dans le sens contraire de la synthèse biologique. Cependant, dans le milieu réactionnel, les radicaux des acides aminés peuvent réagir entre eux et former divers produits autres que la liaison peptidique désirée, tels que des branchements latéraux ou une inversion dans l'enchaînement des acides aminés. Pour rendre le produit désiré majoritaire, il sera nécessaire d'utiliser des groupements protecteurs au niveau des fonctions qui ne doivent pas réagir [24].

La synthèse sur support solide est aujourd'hui la technique la plus utilisée par rapport à la synthèse en voie liquide. Ici, le premier AA est fixé à une résine via son extrémité C-terminale. L'AA suivant est protégé au niveau de son extrémité N-terminale. Ce dernier AA est appelé un AA activé. Grâce à l'introduction d'un agent de couplage, une liaison peptidique se forme entre le premier AA fixé sur la résine et le second AA activé. Les cycles d'additions des AA s'enchaînent ensuite en ôtant la fonction amine du peptide en croissance et en insérant un nouvel AA activé. Entre chaque nouvelle formation

d'une liaison peptidique, un cycle de lavage est opéré afin d'éliminer les AA qui ne se seraient pas couplés correctement sur la chaîne peptidique fixée à son extrémité sur la résine.

Lorsque le peptide complet est assemblé, le dernier AA ainsi que les protections latérales sont retirées et le peptide est clivé du support. La dernière étape est une purification et une caractérisation du peptide.

Parmi les principes actifs disponibles sur le marché et synthétisés chimiquement, nous pouvons citer deux analogues de la GnRH qui sont la triptoréline (Decapeptyl®) et la leuproréline (Enantone®), utilisés entre autres dans le traitement du cancer de la prostate chez l'homme et dans le traitement de l'endométriose chez la femme [25].

II.3. Bio médicaments : Réglementation en vigueur

Le processus de mise sur le marché d'un médicament issu des biotechnologies est différent d'un médicament issu de la synthèse chimique. Ce dernier est consultable sur le site de l'ANSM [26]. Il semble ici important d'informer de façon plus détaillée la réglementation en vigueur pour la production et la mise sur le marché de biomolécules thérapeutiques.

II.3.1. Bioproduction des protéines et peptides thérapeutiques

L'utilisation du matériel vivant dans la synthèse d'actifs thérapeutiques est contrôlée. Elle est régie en France par le décret n°94-352 du 4 mai 1994 relatif à la protection des travailleurs contre les risques résultant de leur exposition à des agents biologiques et modifiant le code du travail [27]. Dans ce décret sont répertoriés et classifiés selon leur degré de pathogénicité les agents biologiques autorisés pour la production de biomolécules.

Au niveau de la réglementation internationale, la bioproduction d'actifs thérapeutiques doit être réalisée dans une zone à atmosphère contrôlée (ZAC) décrite notamment dans les BPF. Quelques différences en terme de réglementation au sein de l'Union Européenne, des Etats-Unis et du Japon sont discutées afin d'être harmonisées grâce aux ICH [5].

Les directives des agences réglementaires nationales et européennes s'assurent que le biomédicament mis sur le marché répond aux critères de sécurité, de qualité et d'efficacité. De plus, les recommandations ICH Q10 sur le système qualité pharmaceutique guident l'industriel durant tout le cycle de vie du biomédicament afin de garantir sa qualité, dès les phases de développement [28].

Toute modification du bioprocédé de production doit être tracé et approuvé par les autorités compétentes. En effet, tout changement peut avoir un impact majeur sur la biomolécule thérapeutique tel qu'une perte de l'activité biologique, une toxicité ou même une perte de stabilité. C'est ainsi que les biosimilaires ont leur procédé de fabrication et leurs matières premières différents de ceux de la biomolécule initiale. Ils ne sont pas égaux en tout point à la molécule d'origine et ne peuvent donc pas être appelés « génériques ». C'est pour cela que la réglementation est très stricte par rapport à ces derniers.

II.3.2. Mise sur le marché d'un biomédicament au sein de l'Union Européenne

L'autorité compétente en charge des dossiers de demande d'AMM des médicaments issus des biotechnologies est l'EMA (*European Medicines Agency*). Plus précisément, le sous-comité décisionnel qui donne cette AMM est le CHMP (*Committee for Medicinal Products for Human Use*) [29].

L'AMM des médicaments issus des biotechnologies est délivrée selon une procédure centralisée.

L'AMM est ainsi valable dans tous les Etats membres de l'Union européenne.

Cette procédure est prévue par le règlement (CE) n°726/2004 du 31 mars 2004 modifié établissant des procédures communautaires pour l'autorisation et la surveillance des médicaments à usage humain et à usage vétérinaire et instituant une Agence européenne des médicaments (EMA) [26].

La réglementation générale en vigueur concernant l'AMM des médicaments issus des biotechnologies suit la directive 201/83/EC. Des directives additionnelles plus précises et revues par des comités d'experts existent pour certains biomédicaments particuliers. Par exemple, la régulation (EC) No

1394/2007 concerne les thérapies innovantes et est revue par le CAT (*Committee of Advanced Therapy*).

La fabrication des médicaments issus des biotechnologies suit la dernière version en vigueur de la Pharmacopée Européenne, les GMP, et est harmonisée à travers les ICH.

Concernant les biosimilaires, en plus des études de comparaison avec un biomédicament de référence, les industriels doivent produire des données précliniques et cliniques décrites dans le code de la santé publique (article L.5121-I 15°). Elles doivent en outre démontrer la qualité, l'efficacité et la sécurité du médicament biosimilaire. La procédure de demande de mise sur le marché fait appel au même règlement communautaire que pour la mise sur le marché d'un biomédicament de référence [31].

II.3.3. Réglementation en vigueur aux USA et au Japon

L'autorité compétente en charge des dossiers de demande d'AMM des médicaments issus des biotechnologies est la FDA (US Food and Drug Administration), plus précisément le sous-comité décisionnel qui donne cette AMM est le CBER (*Center for Biologics Evaluation and Research*).

La réglementation générale en vigueur concernant l'AMM des médicaments issus des biotechnologies suit le CFR21 (*Code of Federal Regulations title 21*).

La fabrication des médicaments issus des biotechnologies doit être conforme au *Public Health Service Act* (l'équivalent du Code de la Santé Publique français), le FD&C Act (*Federal Food, Drug and Cosmetic Act*) et suit également l'harmonisation ICH, notamment pour les essais cliniques.

L'agence réglementaire nationale au Japon est la PMDA (*Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*).

II.4. Contexte et économie

Selon le Leem (Les entreprises du médicament), au 31 mai 2014 (données de 2013), 173 biomédicaments étaient commercialisés en France [6]. La Figure 5 les répertorie selon leur classe pharmacologique. Il est important de noter la part prédominante de protéines thérapeutiques dans ce classement. Vaccins exclus, les protéines thérapeutiques représentent au minimum 52% des biomédicaments sur le marché français. Les peptides synthétiques à usage thérapeutique ne sont pas inclus dans ce recensement car ils ne sont pas par définition des biomédicaments. Ils sont quant à eux 75 à être approuvés par les différentes agences règlementaires [5].

La Figure 6 représente la classification ATC (*Anatomical Therapeutic Chemical*) de niveau 1 des biomédicaments commercialisés en France en 2014. Hormis les vaccins, représentés à travers la classe des anti-infectieux à usage systémique, les protéines thérapeutiques sont présentes en plus grand nombre dans les traitements anti-cancéreux et immunomodulateurs avec plus de 40 biomédicaments sur 173 sur le marché.

NB : La classification ATC de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) subdivise les médicaments en 14 groupes principaux sur la base de l'organe ou du système sur lequel ils agissent. Ils sont ensuite répartis sur la base de leurs propriétés chimiques, pharmacologiques et thérapeutiques en quatre niveaux supplémentaires [32].

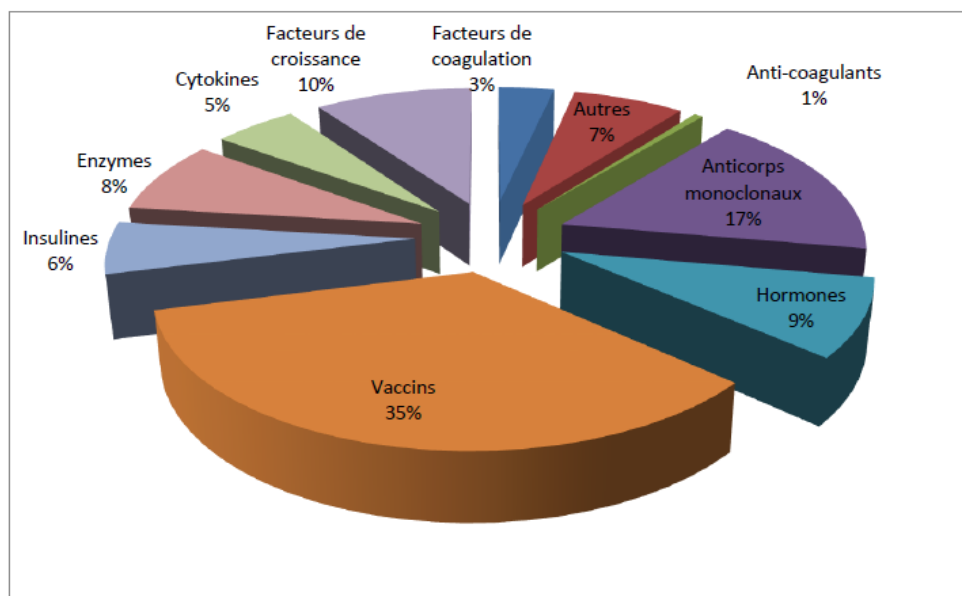


Figure 5 : Classification pharmacologique des 173 biomédicaments commercialisés en France en 2014, Source : Leem

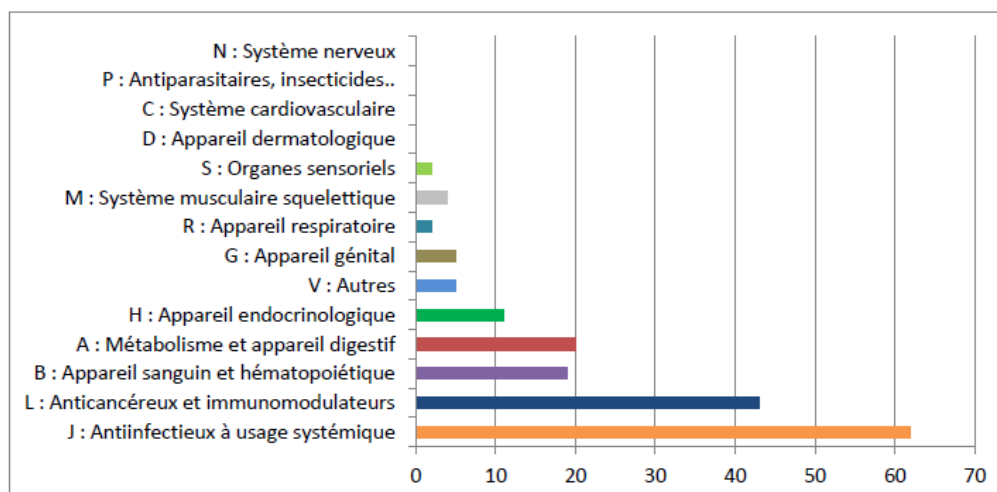


Figure 6 : Classification ATC de niveau 1 des biomédicaments commercialisés en France en 2014, Source : Leem

Le nombre de biomédicaments disponibles sur le marché a connu une hausse exponentielle depuis 1984. En 2013, cette hausse est beaucoup plus légère. En effet, les chiffres de 2012 portaient à 168 le nombre de biomédicaments commercialisés en France, soit 5 nouvelles molécules sur le marché en un an. Le nombre de biomédicaments en développement est lui aussi quasiment équivalent à celui de 2011 (826 en 2013 contre 812 en 2011) [33].

Ces nouvelles demandes d'AMM, bien que modérées depuis deux ans, s'expliquent par le besoin de répondre à des besoins non satisfaits (par exemple les différents types de cancers). Ces besoins ne sont actuellement pas ou peu couverts par les médicaments dits « conventionnels ». Par ailleurs l'accessibilité à ces nouvelles molécules augmentera au fil des pertes de brevets et en parallèle des arrivées des biosimilaires.

En mai 2016, 21 biosimilaires étaient commercialisés en Europe couvrant 7 spécialités de biomédicaments. Les biosimilaires sont environ 20 à 30% moins chers que les produits de référence mais ne représentent encore qu'une minorité des prescriptions.

Les 3 médicaments les plus vendus à l'hôpital en 2010 sont des Acm. Ce sont l'Avastin® (Bévacizumab), l'Herceptin® (trastuzumab) et le Remicade® (infliximab).

La liste complète des biomédicaments disponibles sur le marché français (mise à jour : 2013) est présente en annexe 1. Cette liste montre que les biomédicaments sont essentiellement administrés par injection (IV, IM, SC etc...). La forme lyophilisée est préférée, permettant une meilleure conservation et stabilité de la molécule thérapeutique. Le lyophilisat est reconstitué juste avant l'administration dans une solution de reconstitution. Sinon, les protéines thérapeutiques sont directement formulées sous forme liquide (flacon, ampoule ou seringue). Le dossier d'AMM spécifie les conditions de conservation du médicament. Sauf exceptions, les protéines thérapeutiques sont stockées au froid entre 2 et 8°C [34].

Concernant les peptides synthétiques, au niveau du marché international, 19 peptides bioactifs ont été approuvés entre 2001 et 2012 par la FDA et l'EMA [5], dont 6 uniquement en 2012. Une de ces six molécules, le peginesatide fut retiré du marché américain en février 2013. Ces actifs thérapeutiques traitent entre autres les troubles gastro-intestinaux, l'anémie et les cancers hématologiques, ou

encore le syndrome de Cushing. Cela représente un marché de plus de 11.5 milliards d'euros. 128 peptides sont actuellement en cours d'essais cliniques dont 12 très prometteurs [5].

Cette introduction démontre la grande hétérogénéité des protéines et peptides thérapeutiques, qu'ils soient synthétisés via une source biologique ou bien chimiquement. Elle démontre également leur intérêt croissant, couvrant des besoins non couverts par les médicaments conventionnels. Cependant, ces molécules sont fragiles et leur caractérisation est essentielle avant l'étape de formulation.

III. Problématiques de stabilité des protéines et peptides thérapeutiques : Les enjeux de la microencapsulation

Le Tableau 3 résume les principaux intérêts et inconvénients des peptides et protéines à usage thérapeutique. Bien qu'apportant une très forte valeur ajoutée, ils sont complexes et extrêmement sensibles à toute modification de leur environnement. La stabilité d'une protéine ou d'un peptide est donc un facteur à surveiller durant tout le cycle de vie du médicament et c'est pour cela que beaucoup de recherches sont en œuvre afin de l'améliorer.

Intérêt des médicaments protéiques	Principaux inconvénients
Large spectre de fonctions	Taille et/ou complexité des molécules Rendements et qualité en production différents d'un lot à un autre. Transposition industrielle difficile donc coûts de la production élevée
Haute spécificité d'action et haute activité à des faibles concentrations	Sensible aux modifications physicochimiques (ex : pH, température) Dégradation/stabilité à court et moyen terme engendrant une courte demi vie <i>in vivo</i> .
Réponse à des besoins non satisfaits ou à des nouveaux besoins	Voie injectable privilégiée car faible capacité à traverser les barrières membranaires : méthode invasive douloureuse pour le patient
Bonne tolérance par le patient	Apparition d'effets secondaires liés à la protéine ou à ses produits de dégradation. Phénomène peu observé avec les peptides [5].

Tableau 3 : Intérêts et inconvénients du médicament protéique

III.1. Les problématiques de stabilité

Quand une protéine se replie sur elle-même, constituant ainsi sa structure tertiaire (cf Tableau 2), 80% des parties apolaires des chaînes (Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Cys) sont masquées à l'intérieur de la protéine afin de ne pas rentrer en contact avec l'eau. De nombreuses conformations sont possibles, la plus stable (de moindre énergie) étant celle de l'état natif (N). Ce repliement est déterminé par la séquence en acides aminés, autrement dit la structure primaire de la protéine. Une protéine repliée a une stabilité de conformation définie par ΔG (énergie libre mise en jeu dans la réaction de dénaturation d'une protéine sous des conditions physiologiques). Plus ΔG est grand, plus la protéine est stable. Les interactions mises en jeu dans le repliement d'une protéine sont principalement des liaisons hydrophobes et hydrogène [14].

Différentes conditions de stabilité sont possibles pour une même protéine selon le fabricant et le procédé de purification. La présence de protéases, même à de faibles concentrations peut destabiliser le principe actif. Inversement, une protéine hautement purifiée n'est pas obligatoirement stable car elle est privée de son environnement naturel. En effet ce dernier est composé d'autres protéines, carbohydrates, lipides ou sels, qui aident à stabiliser leur structure.

Ces propriétés intrinsèques doivent être clairement identifiées et sont à prendre en compte à toutes les étapes de la production de la molécule active. En effet, de nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer la stabilité d'une protéine. De plus les protéines et peptides sont susceptibles d'avoir des sites multiples de réaction conduisant à leur instabilité.

La Figure 7 résume les principales réactions menant à l'instabilité d'une protéine ou d'un peptide. Ces réactions peuvent être d'ordre chimique ou physique. Selon le procédé de synthèse, qu'il soit biologique ou chimique, les réactions d'instabilité seront plus ou moins probables [14].

Instabilités physiques	Instabilités chimiques
• Dénaturation • Adsorption • Aggrégation • Précipitation	• Hydrolyse • Oxidation • Racémisation • Isomérisation • β-Elimination

Figure 7 : Instabilités des protéines et peptides

Les instabilités chimiques sont définies comme toute réaction impliquant une modification (clivage ou formation) d'une ou plusieurs liaisons de la protéine et conduisant à une nouvelle entité chimique.

Les instabilités physiques quant à elles engendrent un changement dans les structures secondaires et d'ordres plus élevés de la protéine.

III.1.1. Instabilités physiques

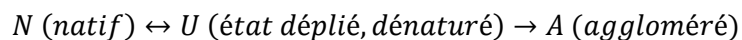
III.1.1.1. La dénaturation

La dénaturation implique une perturbation des structures secondaires et tertiaires de la protéine. En effet, en se dénaturant, la protéine se déplie et perd sa conformation « native ». Ce phénomène est généralement observable à sa température de fusion T_m . La dénaturation peut être réversible ou irréversible. Il peut également arriver que la protéine ne retrouve pas sa structure native correcte lors de son repliement.

Les facteurs impliqués sont le stress thermique, les pH extrêmes et la présence d'agents chimiques dénaturants tels que l'urée ou le chlorure de guanidine [14].

Ainsi, les interactions mises en jeu dans le repliement d'une protéine sont défavorisées par la chaleur. La température à laquelle 50% des molécules sont dépliées/dénaturées est définie par la température de transition T_m . La T_m n'est pas une valeur fixe. Elle peut en effet varier selon les facteurs environnementaux tels que le pH. La température de transition varie la plupart du temps autour de 40-80°C.

En solution, l'état replié d'une protéine n'est pas tout à fait stable dû aux interactions intermoléculaires protéine-solvant.



La transition entre N et U est extrêmement rapide. En effet, n'importe quelle portion de la protéine perturbée conduit au dépliement complet de la protéine (phénomène coopératif). Un intermédiaire de réaction entre N et U peut exister, nommé U^* . Ce genre de système démontre une cinétique biphasique de dénaturation (exemple de l'interféron [14])

III.1.1.2. L'adsorption

La protéine dans sa conformation native repliée contient un cœur hydrophobe protégé du milieu extérieur plus hydrophile. Lors de la rencontre avec une surface hydrophobe (plus particulièrement l'interface air/eau), la chaîne polypeptidique se déplie, laissant les parties hydrophobes être en contact et interagir avec cette surface, menant à l'adsorption. Ce mécanisme est irréversible et entraîne un changement de la structure secondaire de la protéine. L'adsorption peut être suivie d'une agrégation. Ce phénomène est concentration dépendant. La séquence primaire de la chaîne polypeptidique détermine également en grande partie les risques d'adsorption de la protéine sur une surface hydrophobe.

Les facteurs aggravant le phénomène sont multiples. Plus la masse molaire est importante, plus la protéine aura un risque de s'adsorber sur une surface. Le pH proche du pI, les faibles liaisons engagées dans la structure de la protéine, l'agitation intense et la faible concentration protéique sont d'autres facteurs aggravants [14].

Ce phénomène peut également se produire à l'interface protéine/contenant (voir paragraphe II.2.b) Les enjeux du procédé de production et du conditionnement primaire).

III.1.1.3. L'agrégation

L'agrégation se déroule généralement en 3 étapes: Tout d'abord, la protéine change de conformation, se déplie, exposant ses parties hydrophobes au milieu aqueux (par exemple lors du phénomène d'adsorption). Les résidus hydrophobes de chaque protéine dépliée s'associent entre eux à travers des liaisons, covalentes ou non, afin de réduire cette exposition. C'est ce qu'on appelle l'étape de nucléation, dans laquelle les protéines se stabilisent par interactions intermoléculaires. Une association entre deux protéines forme ainsi un dimère. La dernière étape est une étape de croissance par associations successives de protéines incorrectement repliées entre elles, engendrant une élongation du fibrille. La structure tertiaire et quaternaire de la protéine est ainsi modifiée. Pour rappel, toute modification des hautes structures de la protéine peut engendrer une baisse, voire une perte de l'activité de la protéine, ainsi que des réactions immunogènes lors de l'administration chez l'homme [14].

Les agrégats de protéines peuvent être solubles (quantifiés par des techniques chromatographiques) ou insolubles (observables par spectrophotométrie UV et par diffusion dynamique de la lumière également appelée DLS) dans leur milieu.

Ce phénomène est concentration-dépendant. Il est très commun durant le développement de la formulation et le procédé pharmaceutique. Par ailleurs, étant donné que ce phénomène survient lors de tout changement dans l'environnement de la molécule, il peut donc également survenir une fois administré chez l'homme, causant une amyloïdose [35]. Cette pathologie, caractérisée par une accumulation de protéines insolubles dans les tissus, est souvent rencontrée localement, au niveau du site de l'injection, chez les patients diabétiques de type 1 se traitant avec de l'insuline, protéine particulièrement sujette à l'agrégation. Pour terminer, le phénomène d'agrégation peut survenir avant l'administration, bouchant les tubulures et les systèmes d'injection, et rendant impossible le traitement.

III.1.1.4. La précipitation

La précipitation suit généralement l'agrégation. Les protéines agrégées ont une plus haute masse molaire et une plus forte densité, les conduisant à précipiter au fond de leur contenant.

III.1.2. Instabilités chimiques

III.1.2.1. L'hydrolyse

L'hydrolyse est une réaction causée par une molécule d'eau et engendrant la rupture d'une liaison covalente. Dans le cadre d'une protéine, c'est la liaison peptidique qui est concernée par la rupture. Ces réactions d'hydrolyse peuvent survenir à de nombreux endroits au niveau de la protéine. L'hydrolyse a des effets sur l'activité de la protéine, sa demi-vie, sa conformation, son agrégation et/ou son immunogénicité. Les effets seront différents selon la protéine. Quelques exemples non exhaustifs sont cités ci-dessous [14] :

- Dégradation de la séquence N-terminale contenant en avant dernier un résidu Proline (Pro)
- Dégradation des résidus d'Acide aspartique (Asp)
- Désamination de l'Asparagine (Asn) et de la glutamine (Gln)

NB : La désamination de l'Asparagine (Asn) et de la glutamine (Gln)

Ces deux AA perdent leur groupement amine lors de la réaction d'hydrolyse sous forme d'une libération d'ammoniaque et création d'un acide carboxylique. Le mécanisme est généralement catalysé par une réaction acide base [36]. Le pH est en effet le facteur exogène le plus significatif dans la réaction de désamination avec une forte hydrolyse à pH extrêmes.

Un pH neutre minimiserait donc ce phénomène. En général, une désamination est catalysée par une base, la chaleur et la force ionique. Un pH faible est donc plus souvent désiré afin de réduire le phénomène. Cette réaction est en revanche inhibée par l'ajout de solvants organiques.

III.1.2.2. L'oxydation

L'oxydation est une réaction chimique d'oxydo-réduction se déroulant en présence d'oxygène. Cette réaction produit des radicaux libres susceptibles d'attaquer les protéines afin de les dégrader. Elle peut être catalysée par les métaux comme le fer mais également par les rayons UV [37].

Ainsi durant le stockage de protéines thérapeutiques, certains résidus d'AA des protéines peuvent s'oxyder. En effet beaucoup d'excipients dans la formulation peuvent initier cette oxydation si leur degré de pureté est insuffisant (présence de traces d'ions métalliques ou de peroxydes d'hydrogène apportant des radicaux libres). Les protéines peuvent également être exposées à ces agents durant le procédé de fabrication. C'est pour cela qu'il est impératif de protéger certaines protéines sensibles à l'oxydation contre la lumière et de bien contrôler le pH de la solution.

III.1.2.3. La réaction de Maillard

La réaction de Maillard correspond à l'action des sucres sur les protéines [14]. Les facteurs influençant cette réaction sont multiples. Tout d'abord, plus le sucre réducteur est gros, plus la réaction est difficile. On préférera également un pH supérieur à 6 afin de minimiser le phénomène. De plus, l'eau est un réactif mais aussi un produit de la réaction. Ainsi, si l'eau est en trop grande quantité dans le milieu (supérieur à 60 %), les réactions de déshydratation sont inhibées. À l'inverse, en dessous de 30 % la réaction est inhibée par manque de réactif. Pour terminer, plus la température augmente, plus la vitesse de la réaction est importante.

Les réactions de racémisation, isomérisation et de β -Élimination ne seront pas abordées plus en détails.

III.2. La stabilité d'une protéine : un phénomène multifactoriel

La section III.1 insiste donc sur le fait que la stabilité des protéines et des peptides thérapeutiques est critique quelle que soit l'étape de fabrication du principe actif et doit être strictement contrôlée. Le paragraphe suivant traite de l'étape de formulation.

III.2.1. Les enjeux de la formulation

Il est essentiel que la protéine conserve son activité dans l'environnement dans lequel elle sera formulée. La caractérisation de la protéine est donc primordiale avant même d'élaborer sa formule car elle permettra de déterminer son environnement idéal (pH, température etc...) et les facteurs conduisant à son instabilité. Il est donc déterminé avant le développement de la formulation les principales caractéristiques de la protéine [14] :

- Ses propriétés physico-chimiques : Masse molaire, AA, point isoélectrique (réalisé par électrophorèse ou par focus isoélectrique), température de fusion T_m

Aux pH éloignés du point isoélectrique (pI), une augmentation des répulsions électrostatiques entre charges du même signe est observée. Inversement au pI, les charges de la protéine sont neutres. Une protéine a donc plus de chances de précipiter à son point isoélectrique et doit se situer en dessus ou en dessous de celui-ci.

Par ailleurs, à sa T_m , une protéine est plus susceptible de se dénaturer.

- Son empreinte, souvent réalisée par Dichroïsme Circulaire, technique qui permet de visualiser le repliement de la protéine. La protéine formulée sera ainsi ré analysée et comparée à l'empreinte réalisée au temps initial.
- Sa pureté, ses impuretés et contaminants. Les produits de dégradation des protéines thérapeutiques ne sont pas aisément détectés par une seule technique analytique ; les méthodes de détection les plus utilisés sont la spectrométrie de masse et l'HPLC.
- Son activité biologique:

Ces essais peuvent être réalisés chez l'animal, sur culture cellulaire ou par immunocytologie et donnent une mesure quantitative de l'activité biologique de la protéine. Les principaux tests analytiques exploités afin de caractériser une protéine ou un peptide sont présentés en annexe 2.

Connaitre les principales caractéristiques d'une protéine thérapeutique permettra par exemple de connaitre sa concentration critique par le biais d'un test souvent réalisé par dosage colorimétrique. L'agrégation des protéines est concentration-dépendante. De fortes concentrations protéiques conduisent à l'instabilité de celles-ci mais l'inverse est également possible. D'une manière générale les protéines supportent des concentrations de l'ordre de 1mg/mL. Les solutions concentrées peuvent être plus résistantes à la congélation.

La solubilité d'une protéine est la capacité de ses résidus polaires à interagir avec l'eau. Les résidus hydrophobes sont donc repliés à l'intérieur et la protéine garde sa structure active. Elle doit être maintenue durant la demi-vie du produit. Typiquement, les feuilletts β sont moins solubles que la conformation hélicoïdale.

Connaitre ces principales caractéristiques permettra également de présélectionner les excipients qui seront à même de garantir la stabilité de la protéine sous les conditions de stockage qui seront définies. Les tableaux ci-dessous référencent les excipients les plus couramment utilisés dans une formulation

de protéines thérapeutiques destinée à la voie injectable. La fonction de ces différents excipients est avant tout de garantir la stabilité de la protéine dans le temps. Nous pouvons voir que cette liste est plutôt restreinte, car d'une part ces excipients ne doivent pas dégrader la protéine (interactions protéine-excipient néfastes) et d'autre part les excipients doivent être tolérés et autorisés pour être injectés. Ces excipients sont classés selon leur rôle technologique. Une distinction est également faite entre les excipients utilisés pour formuler une poudre de lyophilisat à reconstituer extemporanément ou bien une solution de protéine prête à l'emploi (incluant le soluté de reconstitution pour les poudres lyophilisées). Le choix de la forme galénique dépendra de la stabilité de la protéine à formuler, qui peut être améliorée à l'état solide ou en solution. Il est à noter que le procédé de lyophilisation est très coûteux [21].

Quel que soit la forme galénique, le produit final a une faible période de péremption et doit être conservé à basse température. Le respect de la chaîne du froid de la production jusqu'à l'administration au patient est donc un point essentiel [21].

Le Tableau 4 décrit les excipients les plus couramment utilisés dans les formulations liquides de protéines thérapeutiques. Il concerne également les excipients utilisés dans les solutés de reconstitution afin de remettre en solution extemporanément un lyophilisat de protéines. Le Tableau 5 décrit quant à lui les excipients les plus couramment utilisés dans les formulations lyophilisées de protéines thérapeutiques.

Catégorie	Exemples	Commentaires généraux	Particularités
Solutions de protéines / Soluté de reconstitution			
Les ajusteurs de pH	- Tampon acétate - Tampon citrate - Tampon phosphate - Tampon tris (Trishydroxyméthylaminométhane) - Glycine - Histidine	Les ajusteurs de pH aussi appelés agents tampons contrôlent le pH de la solution et optimisent la stabilité de la protéine. Le pH conditionne en effet la solubilité de la protéine. Ces ajusteurs de pH peuvent être des AA tels que la glycine ou l'histidine ou bien des préparations de solutions tampons décrites dans la Pharmacopée Française [38] et Européenne [39]. Ils maintiennent la structure de la protéine et donc par conséquence son activité biologique, de par l'intégrité des résidus d'acides aminés. Ils couvrent une zone pH allant de 3 à 10. (choix du tampon selon le pH cible)	Le pH peut changer selon la température du milieu. Ces excipients risquent de se décomposer durant le stockage [40]. <u>Tampon Citrate</u> : Ce tampon peut affecter la solubilité et causer la gélification d'Acm formulés à haute concentration. Il peut également se décomposer si il est exposé à la lumière ou à des trace de métaux => Les matières dégradées interagissent et déstabilisent la protéine. <u>Tampon Tris</u> : A température élevée, ce tampon se décompose durant le stockage. Ses produits de dégradation interagissent et déstabilisent la protéine.
Les antioxydants	- Histidine - Méthionine - Acide ascorbique - Glutathion - EDTA/DTPA	L'histidine et la méthionine, de même que les agents réducteurs tels que l'acide ascorbique et le glutathion, protègent les protéines contre l'oxydation catalysée par les ions métalliques [40]. Certains agents chélateurs tels que l'EDTA et le DTPA inhibent l'oxydation des protéines thérapeutiques. Ils ont donc seulement une activité anti oxydante mais restent classés dans cette catégorie.	Les agents chélateurs peuvent également augmenter la stabilité de la protéine en association avec l'éthanol [40]. Les solvants organiques augmentent les forces d'attraction et facilitent ainsi l'agrégation des protéines entre elles. L'acide ascorbique et le glutathion peuvent conduire à l'instabilité de la protéine. Une exposition à la lumière accélère le phénomène d'oxydation.

Le tableau continue à la page suivante

Catégorie	Exemples	Commentaires généraux	Particularités
Solutions de protéines / Soluté de reconstitution			
Les stabilisants	- Sucrose - Tréhalose - Sorbitol - Glycérol - Glycine - Les dérivés de cyclodextrines - Polysorbate 20 - Polysorbate 80 - Chlorure de sodium - Les ligands spécifiques	Les osmolytes augmentent la stabilité de la conformation des protéines thérapeutiques [41]. Les osmolytes protecteurs sont divisés en trois classes chimiques : - Les polyols - Les acides aminés - Certaines méthylamines Les polyols tels que le sucrose, le tréhalose et le sorbitol sont très souvent utilisés comme excipients pour stabiliser la protéine en formulation liquide, particulièrement lorsque la protéine y est hautement concentrée (liaisons de covalentes du carbohydrate avec la protéine). Les tensioactifs non ioniques tels que les polysorbates 20 et 80 diminuent l'adsorption et/ou l'agrégation des protéines sur les surfaces hydrophobes provoquée par l'agitation. Ils aident également au bon repliement de la protéine. L'approche la plus efficace pour améliorer la stabilité de la conformation de la protéine thérapeutique est de prendre en compte les sites de liaison d'un ligand inhérents à la protéine. Pour donner un exemple, la liaison de l'arginine par le tPA (tissue plasminogen activator) augmente fortement la solubilité et la stabilité durant le stockage de l'enzyme.	- Les polyols stabilisent par répulsion les micro-organismes mis sous condition de stress (température élevée, déshydratation, oxydation catalysée par les métaux). Par augmentation du Tm de la protéine, ils stabilisent et inhibent l'agrégation. Le pouvoir stabilisant augmente avec la concentration et la taille des polyols. Les polyols peuvent générer une réaction de Maillard (voir section II.1.b)). Les polyols peuvent se dégrader ou contenir des impuretés néfastes pour la stabilité de la protéine. Peut être cité comme exemple les solutions de dextrose pouvant contenir du 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF). - Les acides aminés protègent quant à eux les cellules contre l'environnement extracellulaire riche en sel. - Les méthylamines protègent les composants cellulaires des effets délétères de l'urée. Les tensioactifs non ioniques sont utilisés à de petites concentrations. Les tensioactifs ioniques peuvent quant à eux se lier aux groupes polaires et non polaires de la protéine et causer une dénaturation de celle-ci. Les polysorbate 20 et 80 peuvent contenir des ions peroxydes qui sont susceptibles d'oxyder la protéine. Ils peuvent également se dégrader de multiples manières avec des effets variés sur la stabilité de la protéine.

Le tableau continue à la page suivante

Catégorie	Exemples	Commentaires généraux	Particularités
Solutions de protéines / Solutés de reconstitution			
Les agents de tonicité	- Chlorure de sodium - Caprylate - Tryptophanate	Les sels sont utilisés comme agents de tonicité dans les formulations de protéines.	Les sels peuvent affecter la stabilité et l'intégrité de la conformation de la protéine. Ces effets suivent la série de Hofmeister. *
Les agents solubilisant	- Chlorure de sodium - Les ajusteurs de pH - Les stabilisants	Certains ions solubilisent les protéines. La série de Hofmeister classe les ions selon leur capacité à solubiliser la protéine* La solubilité d'une protéine est faible lorsque le pH de la solution est proche de son pHi. A ce pH la protéine se comporte comme une molécule Neutre. Il y a donc peu de possibilités d'interaction avec l'eau par le biais de liaisons hydrogènes. Les stabilisants tels que les osmolytes maintiennent la stabilité de conformation de la protéine, évitant les phénomènes de précipitation (désolvatation) [41]	Les sels peuvent affecter la stabilité et l'intégrité de la conformation de la protéine. Ces effets suivent la série de Hofmeister. *
Les conservateurs anti-microbiens	- Alcool benzylique - Métacrésol - Phénol	Les formulations injectables multi-dose doivent contenir des conservateurs afin de prévenir la croissance microbologique. Le conservateur le plus couramment utilisé dans les formulations de peptides et protéines thérapeutiques est l'alcool benzylique.	Les composés phénoliques peuvent causer une aggrégation de la protéine. Ce phénomène serait concentration dépendant. L'alcool benzylique peut également affecter la structure et la stabilité de la protéine. Ce phénomène serait temps, concentration et température dépendant. A cause de ces effets déstabilisants, les formulations lyophilisées de protéines sont reconstituées avec un solvant contenant un composé phénolique dilué. Cela minimise le temps de contact avec la protéine avant l'administration.

Tableau 4 : Principaux excipients pharmaceutiques destinés dans la formulation de solutions de protéines thérapeutiques (incluant les solutés de reconstitution)

**NB : La série de Hofmeister : Cette série est une classification des ions selon leur capacité à solubiliser la protéine. Cette série distingue les ions provoquant une baisse de la solubilité des protéines (« salting out ») des ions capables d'augmenter la solubilité des protéines par augmentation de la force ionique (« salting in »). L'anion phosphate et le cation ammonium sont les plus efficaces pour précipiter les protéines; l'anion chlorate et le cation Ca^{2+} sont au contraire les plus efficaces pour les remettre en solution. Le chlorure de sodium avec l'anion chlorure est rangé quant à lui au milieu de la série de Hofmeister [22].*

Catégorie	Exemples	Commentaires généraux	Particularités
Lyophilisat à reconstituer			
Les agents de charge	- Glycine - Mannitol	Un agent de charge compense les pertes en masses dues au départ de l'eau. Il permet d'obtenir un gâteau de lyophilisat adéquat sans perte du volume initial [42].	Le sorbitol et le mannitol peuvent cristalliser lors de l'étape de congélation et peuvent donc déstabiliser la protéine. Cependant ; un mélange de mannitol et de sucrose est très efficace pour formuler des protéines lyophilisées et les stocker de manière optimale. Le sucrose présent dans les lyophilisats qui peut s'hydrolyser en glucose et fructose entraînant un phénomène de glycation des résidus Lysine des protéines.
Les protecteurs / Stabilisants	- Histidine - Sucrose - Polysorbate 20 - Polysorbate 80 - Dextrane - Hydroxyethyl amidon - Polyéthylène glycol - Alcool polyvinylique (PVA) - Polyvinylpyrrolidone (PVP)	Lors de la lyophilisation, <u>les polyols</u> dans la formule aident à la formation d'une matrice vitreuse hautement visqueuse permettant de protéger la protéine (création de liaisons covalentes avec les protéines) <u>Les tensioactifs non ioniques</u> tels que les polysorbates 20 et 80 protègent la protéine lors de la lyophilisation. Les polymères tels que l'hydroxyethyl amidon, le PVP et la PVA stabilisent également la protéine lors de la lyophilisation.	

Tableau 5 : Principaux excipients pharmaceutiques destinés dans la formulation de lyophilisats de protéines thérapeutiques [40]

En se basant sur les données de la littérature et l'expérience, nous pouvons identifier de manière empirique les excipients qui pourraient stabiliser la formulation. Cependant, en prenant en compte les excipients, leur concentration et les différentes combinaisons possibles, un nombre trop important d'essais est à réaliser. La réalisation d'un plan d'expériences tel que celui réalisé lors de cette étude (se référer à la section III.) permet ainsi de trouver la formule optimale pour le PA. Plus récemment, des analyses multidimensionnelles ont été développées. Elle consistent en l'utilisation de plusieurs outils biophysiques afin d'évaluer la stabilité, la solubilité et l'agrégation de la protéine en présence de différents excipients à travers des diagrammes de phase empiriques [43], [44]. Ces outils sont difficiles à maîtriser mais semblent tout de même important de mentionner ici.

III.2.2. Les enjeux du procédé de production et du conditionnement primaire

Lors du développement du procédé de production de protéines thérapeutiques, trois paramètres de procédé majeurs impactent la stabilité de la protéine. Ces trois paramètres sont l'agitation, le chauffage et les pressions élevées. En effet, les opérations d'agitation et de cisaillement engendrent une exposition des parties hydrophobes dans le milieu environnant de la protéine, initiant l'agrégation. L'application de hautes pressions favorise également le dépliement des protéines.

Les protéines sont des molécules ayant des propriétés de surface. Elles sont connues pour s'adsorber et s'accumuler aux interfaces, telles que les interfaces solide/liquide ou air/liquide. Les réactions au niveau de ces interfaces entraînent très souvent une détérioration, des perturbations structurales, des dégradations chimiques et/ou une agrégation de la protéine. Ces interfaces peuvent avoir une surface hydrophiles ou hydrophobe. Au contact de surfaces hydrophiles, les protéines s'adsorbent par attractions électrostatiques entre les groupes chargés de la protéine et de la surface en contact avec la protéine, entraînant leur agrégation. Au contact de surfaces hydrophobes, les protéines subissent un réarrangement structural lent dans le but de maximiser les interactions hydrophobes, entraînant encore une fois leur agrégation.

Idéalement, toutes les étapes de fabrication du biomédicament devraient faire l'objet d'une analyse de risque afin d'évaluer l'impact d'une quelconque action sur la stabilité de la protéine. C'est d'ailleurs l'enjeu des recommandations ICH Q9 qui apportent une base dans la gestion de risque liée au développement d'un médicament qu'il soit ou non issu des biotechnologies [45].

Plus récemment, la réglementation est plus stricte sur les matériaux utilisés lors de la production (en contact direct avec le principe actif), rentrant dans la composition du conditionnement primaire et du dispositif d'administration (comme les seringues par exemple). En effet, certains matériaux sont susceptibles de relarguer des composés appelés « leachables » ou « extractables ». Ces composés peuvent mettre en péril la sécurité et l'efficacité du médicament. Ils peuvent en effet provoquer une toxicité aiguë à l'injection ou une toxicité à long terme lorsque l'exposition est répétée. Ces composés peuvent également interagir avec les protéines ou les excipients engendrant une altération des propriétés physico-chimiques, de la stabilité du principe actif ou bien de la demi-vie du biomédicament [46], [47].

Les industries pharmaceutiques investissent maintenant beaucoup de ressources afin d'identifier, quantifier et minimiser le taux d'impuretés dans leur produit final. Des groupes de travail [48], [49] ainsi que des guides rédigés par les autorités compétentes [28], [50] ont de ce fait vu le jour.

NB : Définition « Extractables » et « Leachables »

Extractables (=Extractibles en français): Composés qui peuvent être relargués d'un matériau dans des conditions extrêmes (température, temps et solvants).

Leachables (=relargables en français) : Composés provenant d'un matériau et migrant vers la formulation sous des conditions normales d'utilisation ou de stockage.

Ces composés sont à titre d'exemple les ions métalliques [51], et le bisphénol A [52].

Ces composés sont relargués du conditionnement primaire, mais aussi des matériaux en contact avec la protéine au cours du procédé de fabrication. Le Tableau 6 résume de manière non exhaustive les principaux matériaux impliqués dans ce phénomène.

Matériaux en contact avec la substance active durant le procédé de fabrication	Conditionnement primaire
Les matériaux plastiques [53]: - les conteneurs de stockage - les tubes - les filtres - les joints L'acier inoxydable Le caoutchouc	Les contenants les moins affectés sont les verres non traités ou traités par du silicone et du polypropylène. Les contenants les plus affectés sont les verres traités par des sulfures et polyesters.

Tableau 6 : Matériaux impliqués, leachables et extractables

III.3. Formulations innovantes de protéines pour la voie injectable : Cas des suspensions microparticulaires injectables

Les deux précédents chapitres ont abordé les difficultés à mettre au point une formulation de protéines ou peptides thérapeutiques destinés à la voie injectable. En plus de ce défi technologique, la durée de vie de ces molécules actives après administration est limitée due aux dégradations enzymatiques et/ou à l'importante clairance rénale [5]. Ceci a pour conséquence l'administration de manière répétée et périodique du médicament, spécialement dans le cas de patients ayant une maladie chronique et nécessitant un traitement à long terme. L'injection de ces médicaments est une méthode invasive, douloureuse, et souvent réalisée par un professionnel de santé. La conséquence de tout cela est la faible adhésion du patient au traitement.

Des formes injectables à libération prolongée ou contrôlée sont donc développées pour faire face à la demi-vie courte des protéines et peptides thérapeutiques administrés par la voie parentérale [54]. En plus d'augmenter l'intervalle entre deux administrations, cette technologie a également l'intérêt d'éviter les pics de concentration rencontrés pour les formes galéniques classiques au moment de l'injection. La formulation de protéines thérapeutiques à libération prolongée justifie par ailleurs d'un dépôt de brevet qui prolonge la protection intellectuelle de la molécule initiale, problématique de plus en plus d'actualité avec les expirations récentes ou prochaines des brevets des premières protéines thérapeutiques comme l'EPO, l'insuline ou l'interféron alpha [55]. Des formulations de peptides injectables à libération prolongée pour un usage humain ou vétérinaire existent d'ores et déjà sur le marché.

Une description rapide des différentes approches (galéniques ou chimiques) permettant l'obtention de systèmes d'administrations injectables à libération prolongée / contrôlée sera présentée et discutée.

III.3.1. Les différentes approches disponibles

Afin de développer des protéines ou peptides thérapeutiques à libération prolongée et contrôlée, deux approches sont disponibles. Soit la molécule active subit des modifications chimiques, soit une formulation innovante est mise au point, sans modification de la molécule.

Parmi les modifications chimiques, on peut citer la PEGylation, l'hyperglycosylation et la mannosylation. Ces modifications sont apportées à la protéine lors du procédé de synthèse, qu'elles soient chimiques ou biotechnologiques, donc en amont de la formulation. Elles permettent d'améliorer la performance et la stabilité des protéines thérapeutiques *in vitro* et *in vivo* et également de prolonger leur rémanence vasculaire (diminution la clairance rénale) [55]. Cette première option intervient tôt dans le cycle de vie du médicament, à l'étape de production de la substance active.

En outre, il est également possible, sans modification préalable du PA, d'élaborer une formulation innovante permettant de mettre à disposition de manière plus ou moins progressive le principe actif après son administration. Les suspensions injectables de particules sont des formulations pouvant répondre à cet objectif. Par association ou encapsulation de la molécule active, ces systèmes assurent la protection des protéines et peptides, la libération prolongée et le contrôle du taux plasmatique. La Figure 8 schématise l'ensemble des systèmes de délivrance, qui peuvent se distinguer selon leur taille (systèmes colloïdaux et systèmes micro-particulaires), la nature de leur constituant ainsi que leur structure interne.

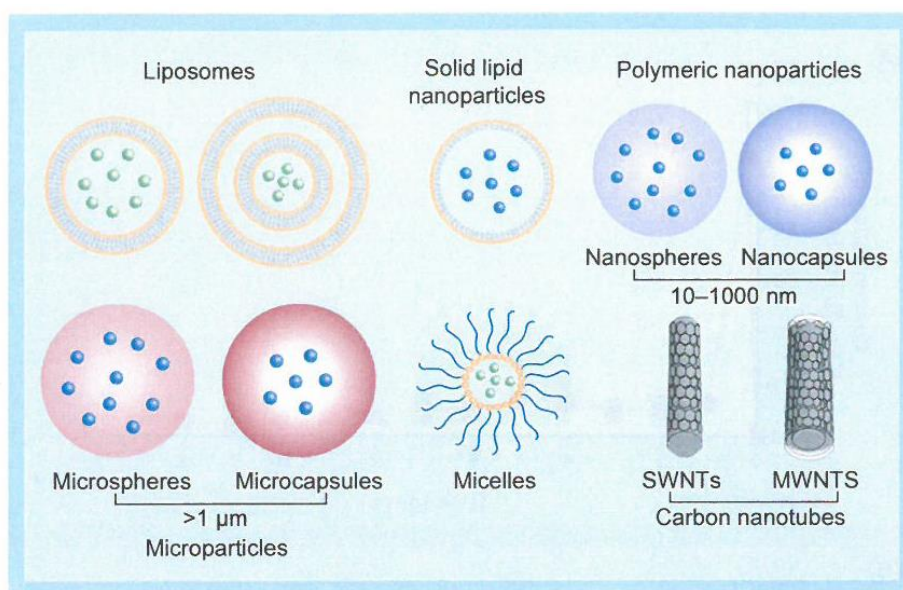


Figure 8 : Les différents systèmes de délivrance micro-particulaires et colloïdaux [56]

Parmi les systèmes de délivrance prolongée / contrôlée les plus étudiés, on peut citer :

III.3.1.1. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules sphériques de taille variable (cf Figure 9) et contenant un cœur aqueux. Ce cœur aqueux, contenant le peptide ou la protéine hydrophile, est enfermé par une ou plusieurs bicouches lipidiques qui le protègent du milieu aqueux extérieur [57].

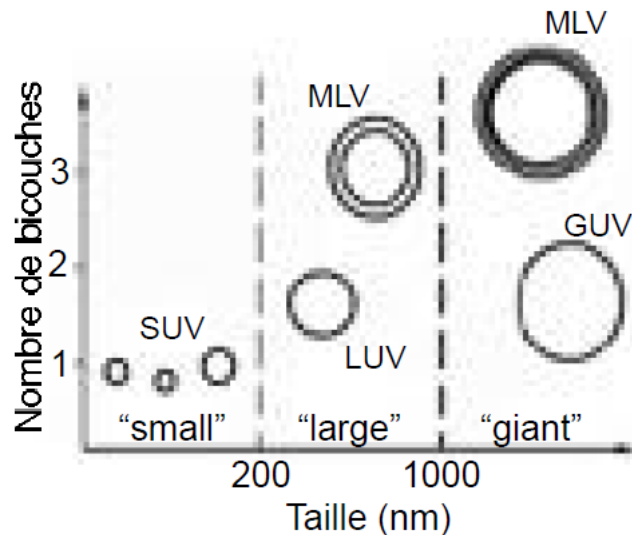


Figure 9 : Classification des liposomes selon leur taille et le nombre de bicouches [57]

SUV : les liposomes unilamellaires de petite taille
 LUV : les liposomes unilamellaires de grande taille
 GUV : les liposomes géants
 MLV : liposomes multilamellaires

Ces liposomes sont biocompatibles et non toxiques. Ils protègent les protéines thérapeutiques de dégradations *in vivo*, prolongeant leur demi-vie et leur biodisponibilité. Cependant, certaines problématiques restent à élucider comme les problématiques de coût, de stabilité des protéines à l'intérieur des liposomes et d'industrialisation du procédé de fabrication [57].

III.3.1.2. Les nanotubes de carbone

Cette technologie est encore au stade de recherche. Les nanotubes de carbone (CNTs) sont des nanostructures cylindriques creuses consistant en un réarrangement hexagonal d'atomes de carbones hybrides sp^2 . Tout comme les liposomes, ils sont classés selon le nombre de couches :

- SWNTs : simple couche
- MWNTs : multi-couches

Les CNTs ont comme application d'être des transporteurs moléculaires pour les protéines qui ont très souvent une forte masse molaire et qui ne peuvent donc pas pénétrer à travers les membranes biologiques [56].

III.3.1.3. Les micelles

Les micelles sont des molécules amphiphiles (tête polaire hydrophile avec un corps apolaire hydrophobe) assemblées lorsque la concentration micellaire critique (CMC) est atteinte de sorte qu'elles forment un agrégat sphéroïdal de quelques nanomètres. Les avantages de ces micelles sont leur capacité d'encapsuler les macromolécules telles que les protéines et de les préserver sans perte de leur stabilité. Elles peuvent également permettre une bonne conservation des protéines durant la lyophilisation [57].

- ***Les microparticules***

Ce sont les particules qui ont le plus été étudiées ces dernières décennies. Elles sont constituées d'un matériau enrobant contenant le PA. Leurs tailles varient entre 1µm et 1mm. Le PA encapsulé peut constituer 5 à 90% de la masse totale de la microparticule.

Les microparticules incluent les microcapsules et les microsphères. Les microcapsules font office de réservoir, autrement dit elles sont constituées d'un cœur liquide ou solide contenant le PA entouré d'une enveloppe. Les microsphères sont une matrice dans laquelle est dispersé le PA.

- ***Les nanoparticules/nanosphères***

Les nanoparticules sont des particules ayant une taille comprise entre 10 et 1000nm et peuvent être synthétisées à partir de lipides (SLNs : *Solid lipid nanoparticles*), polymères ou métaux. Les nanoparticules de polymères peuvent être des nanosphères (le principe actif est distribué uniformément dans la matrice de polymère) ou des nanocapsules (le principe actif est confiné à l'intérieur d'une membrane de polymère). Leurs propriétés sont similaires à celles des microparticules avec comme avantage supplémentaire d'être pleinement compatibles avec la voie IV, dû à leur faible taille.

Les microparticules sont les systèmes de délivrance qui ont été choisis pour la réalisation des essais de formulation qui feront l'objet du prochain chapitre. En effet, elles sont citées de nombreuses fois dans la littérature et leur procédé de fabrication est industrialisable. Cette technologie a d'ailleurs permis la mise sur le marché de spécialités pharmaceutiques à base notamment de peptides.

III.3.1.4. Les microparticules

Le cahier des charges ci-dessous a été établi, décrivant toutes les propriétés essentielles des microparticules développées dans le cadre de formulations injectables de peptides et protéines thérapeutiques pour la libération prolongée [5], [55], [56], [58].

- Les microparticules doivent être biodégradables et biocompatibles

Un produit est biodégradable lorsqu'il peut être décomposé (simplification de la structure chimique avec la minéralisation du carbone sous forme de dioxyde de carbone) par un organisme vivant, dans un environnement favorable [59].

La biocompatibilité est la « *capacité d'un matériau à provoquer des réactions limitées dans le corps* » [60]. Cette définition comprend le caractère non immunogène, non tératogène, non carcinogène et non toxique et/ou irritant des microparticules et de leurs produits de dégradation. Une fois administrés chez l'homme, les microparticules ne doivent donc pas engendrer d'effets indésirables.

- Elles ne doivent pas altérer la structure ou l'activité de la protéine.

Ces contraintes deux premières contraintes sont décrites dans les réglementations en vigueur au sein de chaque pays, par exemple dans la Pharmacopée Européenne dans le cas de l'Europe.

- Elles doivent être de taille suffisamment faible, avec une faible distribution granulométrique et d'aspect lisse et non poreux

Les microparticules peuvent être généralement injectées chez l'homme en voie SC ou IM. Afin de permettre d'une part l'administration à travers une seringue sans obstruction de l'aiguille et l'injection chez l'homme, la taille des microparticules ne doit pas excéder 100µm[55]. Une distribution de taille relativement étroite est également préférée. De plus, la forme de ces particules influencent le taux d'encapsulation ainsi que la cinétique de relargage de la molécule active. Les microsphères doivent ainsi être parfaitement rondes, lisses et non poreuses. En effet, les protéines et peptides peuvent être libérés par diffusion en sortant par les pores si leur diamètre est suffisamment grand pour les laisser passer, sans attendre que le polymère se dégrade. Les microsphères poreuses libèrent donc de manière brutale et intense l'actif thérapeutique dès l'administration. Ce pic de concentration dans le sang est à éviter car il pourrait être dangereux pour le patient.

- Le procédé de fabrication doit permettre d'assurer un rendement d'encapsulation et un taux d'encapsulation de la protéine thérapeutique élevés.
- Le profil de libération du PA à partir de son support microparticulaire doit être continu pendant un temps déterminé et sans libération immédiate élevée (effet « burst) de PA juste après l'injection

En effet ; la quantité de PA en circulation ne doit pas excéder le seuil de toxicité et doit se situer dans l'intervalle de concentration permettant un effet thérapeutique.

- La méthode de fabrication du produit doit également être transposable industriellement, robuste et reproductible.
- Le produit final devra être stable dans sa période de validité prédéfinie, et ce jusqu'à son administration chez l'homme.

De ce fait, dans le cas de poudres lyophilisées à reconstituer extemporanément, la reconstitution doit permettre l'injection chez l'homme (sans phénomène d'agglomération qui obstruerait par exemple l'aiguille).

- Le produit final devra être stérile en vue d'une injection en voie parentérale chez l'homme.

La forme finale peut être soit liquide (suspension de microparticules), soit une poudre sèche à reconstituer extemporanément.

Ce cahier des charges établi ci-dessus conditionne le choix de la formulation et du procédé de microencapsulation.

Le Tableau 7 reprend les différents matériaux utilisés dans le milieu pharmaceutique, ainsi que les différentes techniques de microencapsulation associées. Ces matériaux peuvent être de nature polymère ou lipidiques, naturels ou synthétiques. Les techniques de microencapsulation sont détaillées à la section II.3.d).

	Matière première	Procédé de fabrication
Polymère naturel	Gélatine	Coacervation complexe Coacervation simple
	Chitosane	Coacervation complexe Gélification ou congélation de gouttes Séchage par atomisation Enrobage en lit fluidisé
Polymère synthétique	Copolymères acryliques et méthacryliques	Séchage par atomisation Enrobage en lit fluidisé Evaporation – Extraction de solvant
	Copolymères (acrylo-) vinyliques	Coacervation simple Séchage par atomisation Evaporation – Extraction de solvant
	Homopolymères et copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique (PLGA)	
	Acide polylactique (PLA)	
Polymère cellulosique	Ethylcellulose (EC)	Coacervation simple
	Hydroxypropylcellulose (HPC) ^o	
	Hydroxypropylméthylcellulose (HPMC)	
Lipides et cires minérales	Corps gras solides (esters, alcool, acides gras)	Gélification ou congélation de gouttes
	Glycérides	Solidification d'émulsion
	Cires (d'abeilles, de Carnauba etc...)	Enrobage en lit fluidisé
	Cires minérales	Procédé de coacervation en milieu supercritique

Tableau 7 : Les différents polymères utilisés dans le milieu pharmaceutique [61]

De nombreuses études sont parues ces dernières années, abordant les formulations de microsphères de polymères biodégradables délivrant dans le temps les protéines thérapeutiques qu'elles contenaient. Ceci fait suite aux grandes avancées dans la science du polymère et des technologies de synthèse.

Les PLGA (co polymères d'acides D,L lactiques et glycolique) sont les plus étudiés. Ils sont biocompatibles et biodégradables. Selon leur nature chimique, il est également possible de moduler les profils de libération du PA, ce qui est essentiel lorsqu'on recherche un système à libération prolongée. Ces polymères permettent de former des microsphères encapsulant le PA dans leurs matrices, empêchant l'action des enzymes protéolytiques *in vivo*. Les microsphères de PLGA ont donné lieu à plusieurs mises sur le marché de formulations de peptides thérapeutiques à libération prolongée. Citons la Somatuline® LP dont le principe actif est le lanréotide, octapeptide analogue de la somatostatine traitant l'acromégalie. L'annexe 3 dresse la liste des formulations de protéines et

peptides encapsulés dans des microsphères de PLGA approuvées et disponibles sur le marché. Notons que ces médicaments sont uniquement destinés à la voie IM.

La Figure 10 représente la structure chimique des PLGA. Différents types de PLGA sont disponibles, par exemple sous différentes proportions lactide/glycolide afin d'améliorer la compatibilité protéine ou peptide/polymère. Le groupement terminal de la molécule varie également. Il peut être soit un groupe carboxyle soit un groupe ester, selon le profil de libération du PA souhaité [55].

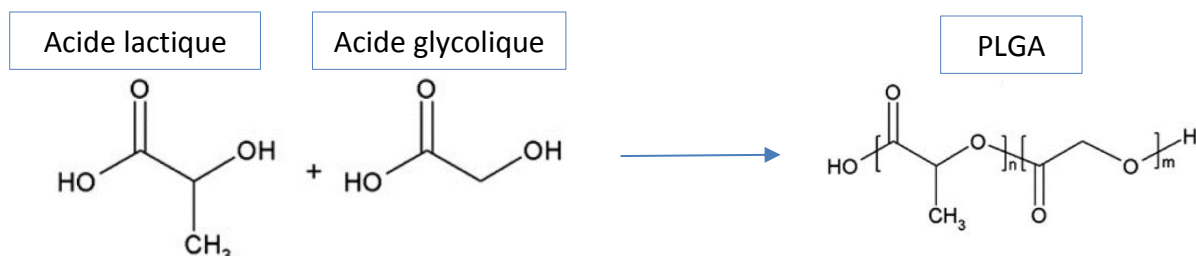
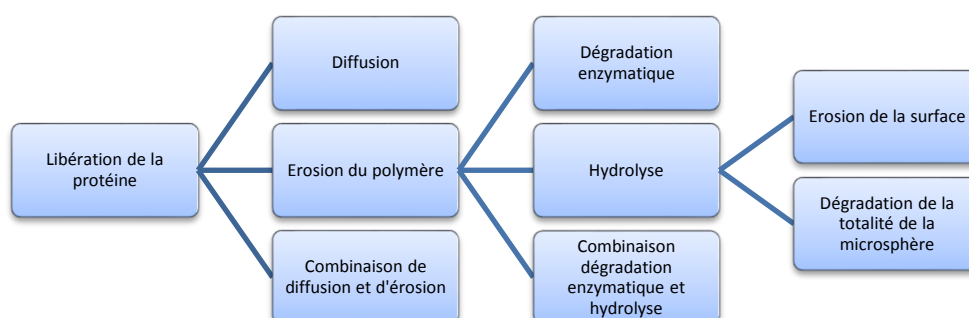


Figure 10 : Structure chimique d'un PLGA et de ses monomères [62]

Le relargage du PA à partir des microsphères de polymère est résumé dans la Figure 11. Il peut se faire par diffusion, par dégradation du polymère ou par une combinaison des deux. Le taux de diffusion dépend des propriétés physicochimiques de la molécule active encapsulée et des propriétés physico-chimiques du matériau d'enrobage [58]. Après administration, les microsphères de PLGA libèrent le PA de manière continue durant plusieurs jours voire même plusieurs mois.

Figure 11 : Mécanisme de libération du PA à partir de microsphère, Figure tirée de la revue [55]



Pour ces différentes raisons les PLGA ont été les polymères choisis pour réaliser des essais de microencapsulation décrits ci-après.

III.3.1.5. Les techniques d'encapsulation

Les principales techniques d'encapsulation permettant de produire des microsphères de PLGA, encapsulant des protéines ou peptides thérapeutiques et destinées à la voie injectable, peuvent être classées en deux catégories et sont répertoriées dans le Tableau 8. Ces techniques sont transposables industriellement.

Procédés physico-chimiques	Procédés mécaniques
Séparation de phases ou coacervation Evaporation – extraction de solvant	Nébulisation/séchage

Tableau 8 : Principaux procédés de production de microsphères de PLGA [61]

La coacervation simple consiste à désolvater un polymère, ici le PLGA. Autrement dit cette méthode consiste à séparer le PLGA, encapsulant le PA, du solvant, en deux phases distinctes. La phase qui contient le polymère encapsulant la protéine sera appelée le coacervat. La phase qui contient le solvant sera appelée le surnageant. Dans le cas des protéines et peptides thérapeutiques majoritairement hydrophiles, une émulsion inverse eau/huile est préalablement formulée avec une solution organique contenant le PLGA dissout et une solution aqueuse contenant le PA. La coacervation du polymère est opérée par l'ajout d'un second polymère incompatible tel que l'huile de silicone avec le PLGA et provoquant sa désolvatation. Les microparticules formées sont ensuite solidifiées au contact d'un bain durcisseur d'heptane [61]. Pour terminer, elles sont très généralement séchées et lyophilisées.

Le procédé de microencapsulation par évaporation de solvant consiste à faire évaporer la phase interne d'une émulsion qui contient le polymère dissout dans un solvant organique, sous forte agitation. Le solvant organique utilisé doit être volatil afin d'être facilement évaporé. Dans le cas de PA hydrosolubles tels que les peptides et protéines thérapeutiques, une technique d'évaporation de solvant basée sur la double émulsion est particulièrement développée [61]. Il s'agit de la technique de l'évaporation de solvant basée sur double émulsion eau dans huile dans eau e/h/e.

La double émulsion e/h/e suit le processus suivant. Dans un premier temps, le PLGA est dissout dans un solvant organique, constituant la phase organique ou huileuse H. La protéine ou le peptide est quant à lui dissout dans un solvant aqueux contenant obligatoirement un agent stabilisant, le tout constituant la phase aqueuse interne E1. La phase aqueuse externe E2 est généralement de l'eau contenant ou non un ou plusieurs agents stabilisants. Il est important que le volume E1 soit inférieur au volume H lui-même inférieur au volume E2. Sous forte agitation, E1 est incorporé dans H formant l'émulsion primaire. Cette dernière est incorporée dans E2 également sous forte agitation. Au niveau des différentes interfaces créées, E1/H, H/E2, E2/air, des transferts de matière s'effectuent tout au long du procédé de microencapsulation. Il s'agit principalement du solvant organique, qui va progressivement s'évaporer, mais aussi du PA présent dans E1. La rapidité et l'importance de ces transferts conditionnent la forme finale des microsphères [61]. De par l'évaporation de solvant, le polymère précipite et par conséquent les microparticules se forment. Après plusieurs lavages, une suspension de microsphères biodégradables contenant la protéine ou le peptide d'intérêt est ainsi obtenue. Cette suspension peut être lyophilisée afin d'augmenter sa stabilité. Des excipients lyoprotecteurs peuvent alors être ajoutés (voir Tableau 5).

Lors de l'élaboration des deux émulsions, les conditions opératoires déterminent la taille et la granulométrie des microsphères de PLGA.

Le procédé de nébulisation/séchage permet d'obtenir des microsphères de PLGA à partir d'une formulation liquide, qu'elle soit une suspension, une émulsion ou une solution. Le liquide initial est nébulisé, formant un aérosol, puis immédiatement séché grâce à un flux d'air d'une certaine température, formant des microparticules. C'est un procédé en continu, simple et reproductible. La température et le débit d'atomisation conditionnent la taille et la forme des particules [61].

Pour terminer, à titre de citation, une technique utilisant la technologie des fluides supercritiques gagne de l'intérêt pour encapsuler des protéines ou peptides.

Le Tableau 9 schématise les techniques présentées ci-dessus. Parmi ces trois techniques, les méthodes de l'évaporation de solvant et de coacervation simple peuvent permettre l'obtention de microsphères de taille homogène selon les conditions opératoires. La technique de la coacervation est complexe à maîtriser. Bien que le rendement obtenu soit nettement supérieur à la technique de l'évaporation de solvant (60% vs 25%), elle nécessite du savoir-faire. Par ailleurs, de nombreuses études bibliographiques relatent la technique d'évaporation de solvant basée sur la double émulsion pour microencapsuler des protéines et peptides thérapeutiques. Afin de respecter le critère d'homogénéité de taille des microsphères mentionné dans le cahier des charges, et parce qu'elle a été le sujet de nombreuses recherches, la méthode d'évaporation de solvant basée sur la double émulsion a été sélectionnée pour les microsphères blanches de PLGA. Ce travail expérimental réalisé au sein de l'entreprise Bertin Pharma est décrit dans le chapitre suivant.

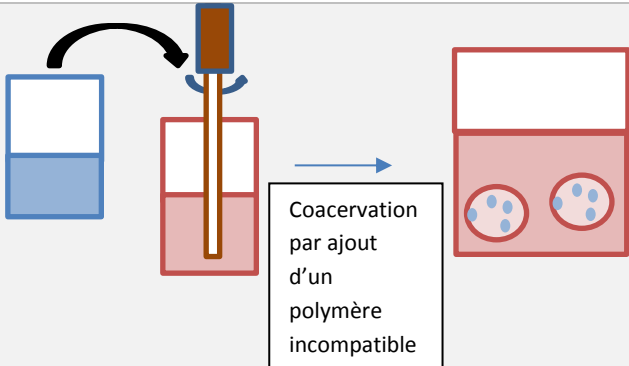
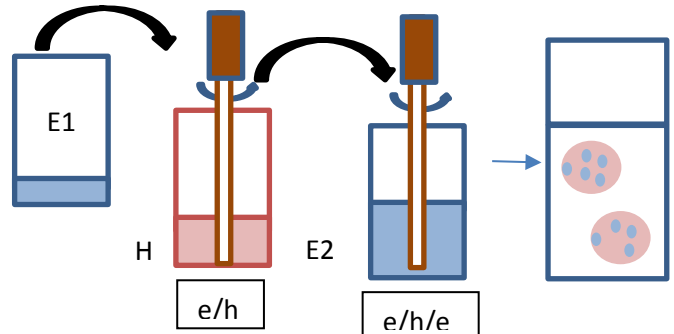
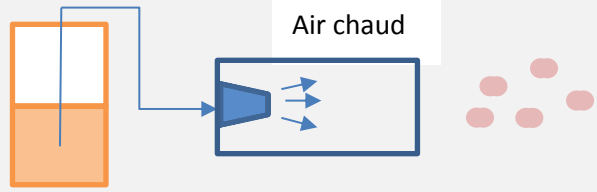
Méthode	Schéma simplifié	Caractéristiques des microparticules	Limites de la technique
La coacervation basée sur l'émulsion inverse eau/huile (e/h)	 Coacervation par ajout d'un polymère incompatible	<u>Taille des particules</u> : 20 à 200µm <u>Distribution granulométrique</u> : dépendante des conditions opératoires <u>Taux d'encapsulation</u> : <60 %	Nécessite beaucoup de savoir faire Présence de résidus de solvant organique
L'évaporation de solvant basé sur la double émulsion e/h/e [63] [64].	 E1 H e/h E2 e/h/e	<u>Taille des particules</u> : 0.5 à 200µm <u>Distribution granulométrique</u> : dépendante des conditions opératoires <u>Taux d'encapsulation</u> : <25%	Faible taux d'encapsulation / Faible rendement Présence de résidus de solvant organique Phénomène d'agglomération, particules collées
Le séchage par atomisation (nébulisation/séchage)	 Air chaud	<u>Taille des particules</u> : 1 à 50µm <u>Distribution granulométrique</u> : large <u>Taux d'encapsulation</u> : <40%	Adhérence des microparticules aux parois du sécheur Non adapté aux composés sensibles à la chaleur Faible contrôle de la taille des particules Faible rendement Agglomération, particules collées

Tableau 9 : Techniques de production de microparticules de PLGA [58] [61]

Légende :

 Phase organique
  Phase aqueuse
  Microparticule de PLGA

 Dispersion de particules solides de protéines ou peptides dans une solution ou émulsion de PLGA
 OU Emulsion de protéines ou peptides dans une solution de PLGA

IV. Essais de micro encapsulation de protéines thérapeutiques dans des PLGA : Technique de l'évaporation de solvant basé sur la double émulsion e/h/e

IV.1. Introduction de l'étude

Le but de l'étude a été de formuler des microsphères de PLGA blanches, c'est-à-dire ne contenant pas de protéines ou de peptides thérapeutiques, pouvant être administrés en voie parentérale, à travers la technique de l'évaporation de solvant basée sur la double émulsion e/h/e. Les résultats de l'étude serviront de base à tout chercheur ou industriel désirant encapsuler une protéine ou un peptide thérapeutique. Cette étude s'est déroulée en deux étapes. Des essais préliminaires ont été réalisés, sur la base des données de la littérature, afin de maîtriser et de s'appropriier le procédé de microencapsulation. Il était question d'ajuster un certain nombre de paramètres afin d'avoir un procédé robuste. A l'issue de ces premiers essais, un plan d'expériences a été élaboré puis réalisé. Le but de ce plan d'expériences était de déterminer l'impact de la formule sur la taille et la forme des particules produites et ainsi de déterminer une formulation permettant de répondre au cahier des charges. Une conclusion a été établie, basée sur les résultats obtenus.

IV.2. Matériels et méthodes

IV.2.1. Matières premières

Les excipients et solvants mis en œuvre sont rassemblés dans le Tableau 10. Les Resomer® RG 503 et RG 503H sont deux types de PLGA qui présentent le même ratio en monomères DL-lactiques et glycolique, de 50 : 50. Leur viscosité se situe entre 0.32–0.44 dL/g. La différence entre ces deux polymère réside dans leur groupement terminal. Le Resomer® RG 503 présente un groupement terminal ester. Le Resomer® RG 503 présente un groupement terminal carboxyle. Le Tableau 11 résume les caractéristiques des deux PVA et du PVP utilisés en tant que stabilisants de la double émulsion.

Matériau	Fournisseur	Fonction
Resomer® RG 503	Evonik	Polymère
Resomer® RG 503 H	Evonik	Polymère
Dichlorométhane (Chromasolv®)	VWR	Solvant du polymère
Oléate de Sorbitan 80 PPI (Montane®)	Seppic	Stabilisant émulsion primaire
Polysorbate 80 PPI (Montanox®)	Seppic	Stabilisant émulsion secondaire
Polyvinylpyrrolidone (Kollidon 17®)	BASF	Stabilisant émulsion secondaire
Polyvinylalcool 8-88	Merck	Stabilisant émulsion secondaire
Polyvinylalcool 40-88	Merck	Stabilisant émulsion secondaire
Chlorure de sodium	Merck Cooper	Stabilisant émulsion secondaire
Eau PPI	Cooper	/

Tableau 10 : Matières

Excipients	Masse moléculaire	Viscosité (spécifications)
PVA 8-88	50000 g/mol *	6.8-9.2 mPa.s (40g/L, eau)
PVA 40-88	205000 g/mol *	34.0-46.0 mPa.s (40g/L, eau)
PVP K17	7000-11000 g/mol (spécifications)	Environ 5 mPa.s (20g/L, eau)[65]

Tableau 11 : Viscosités et masses moléculaires du PVP et du PVA

*données approximatives fournies par les fournisseurs [66]

IV.2.2. Méthodologie

IV.2.2.1. Procédé général de microencapsulation

Les microsphères de PLGA ont été produites par la technique de l'évaporation de solvant basée sur la fonction de double émulsion e/h/e. Pour cela, chaque excipient solide est pesé séparément à l'aide d'une balance (Mettler Toledo PB 3002-S, pesées de 0.5g à 3100g, d = 0.01g ; Mettler Toledo AG204 pesées de maximum 210g, d = 0.1 mg ; Mettler Toledo PR2002, pesée maximum 2100g, d=0.01g). Les excipients rentrant dans la composition de la phase organique appelée PO sont solubilisés dans le solvant organique sous agitation magnétique (plaques d'agitations de chez Stuart ou Bibby), en flacon muni d'un bouchon pour éviter l'évaporation du solvant organique. La phase interne aqueuse (PIA) est ensuite prélevée à la pipette (Pipetman® Classic, 1000 µL, Gilson) puis injectée dans la PO sous forte agitation à l'aide d'un ultraturrax (Heidolph DIAX 900). L'émulsion primaire est ensuite versée dans la phase externe aqueuse (PEA, préparée à l'aide d'une plaque d'agitation chauffante de chez Stuart ou Bibby) sous agitation à température ambiante (plaques d'agitation de chez Stuart ou Bibby ; agitateur IKA WERK RW20 pour défloculeuse ou pales type hélice ; ultraturrax Heidolph DIAX 900). Suite à cette agitation, la double émulsion est obtenue. La double émulsion est laissée sous faible agitation magnétique, sous hotte de la marque Geometra, pendant au minimum 18h à température ambiante afin de laisser évaporer le solvant. L'étape de rinçage qui s'en suit consiste à centrifuger la double émulsion à 2000 rpm pendant 5 minutes (centrifugeuse Jouan GR 4.11). Le surnageant est ensuite enlevé à l'aide d'une pipette pasteur, puis les microparticules sont resuspendues dans de l'eau PPI. L'opération est répétée 3 fois. Les particules sont gardées en suspension dans le plus petit volume possible. Les microsphères obtenues sont ensuite lyophilisées (lyophilisateur Telstar LyoBeta 15; Logiciel LyoLogger V4.03). La Figure 12 ainsi que la Figure 13 schématisent ce procédé de microencapsulation.

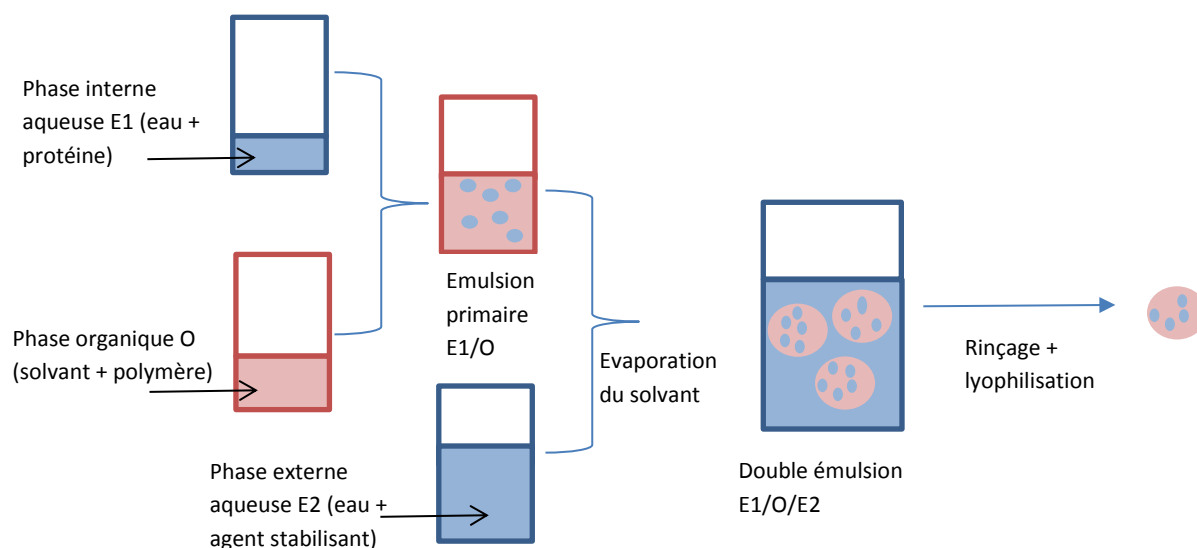


Figure 12 : Technique de l'évaporation de solvant basé sur la formation d'une double émulsion e/h/e

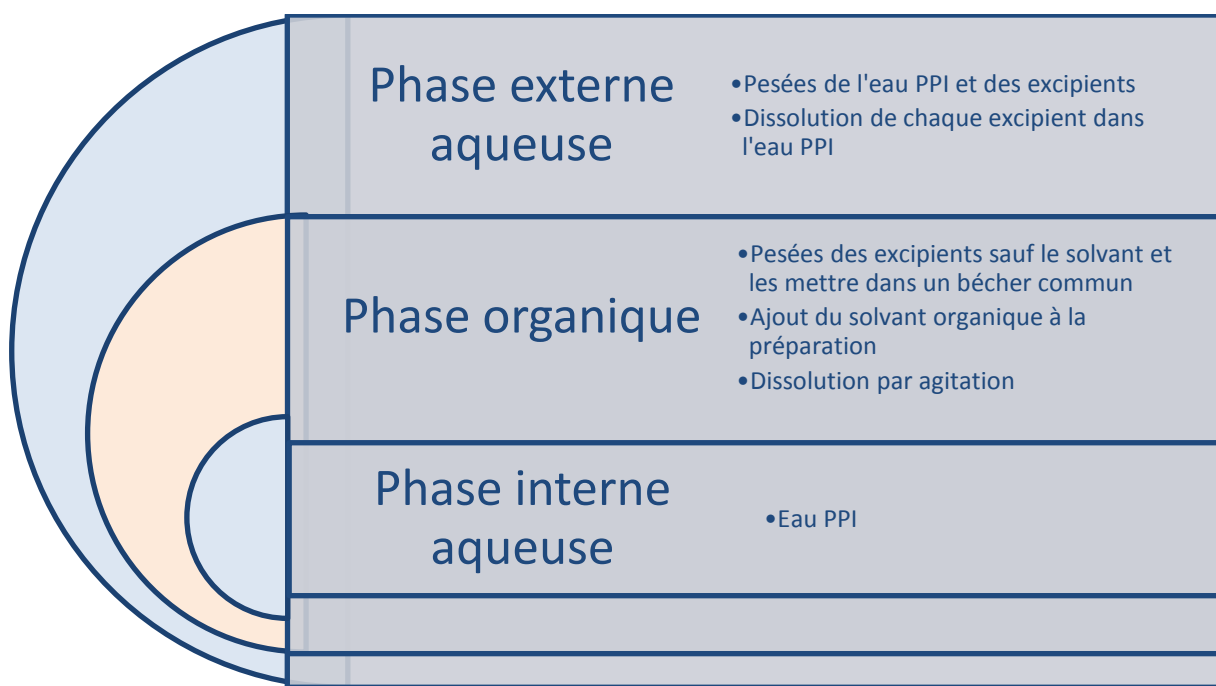


Figure 13 : Préparation des phases

NB 1: Préparation de la PEA

Cette préparation requiert une étape de chauffage si le PVA est utilisé dans la formule. D'après le Handbook of Pharmaceutical excipient, 6 me édition [67] il existe un protocole clair et définir à propos de la solubilisation du PVA en milieu aqueux. Sa dissolution requiert une dispersion du solide dans l'eau à température ambiante suivie du chauffage du mélange à 90 C pendant approximativement 5 minutes.

NB 2 : Conditions opératoires

La préparation de la double émulsion est réalisée à température ambiante. En effet, à températures faible et haute, les microsphères formées sont plus grosses qu'à température intermédiaire. Ce phénomène s'explique car à faible température, la solution est plus visqueuse. A haute température, le solvant organique s'évapore plus vite, concentrant le polymère dans la PO [68].

Par soucis de clarté, les conditions opératoires mises en œuvre seront détaillées sous forme de tableaux dans les prochains paragraphes relatifs aux essais préliminaires (première étape du travail expérimental) et au plan d'expériences (deuxième étape du travail expérimental).

IV.2.2.2. Calcul du rendement

Le rendement est exprimé en pourcentages. Le calcul est le suivant :

$$\frac{\text{Masse de PLGA ajoutée dans la phase organique en grammes}}{\text{Masse de lyophilisat en grammes}} \times 100$$

IV.2.2.3. Tests réalisés sur les microsphères

Pour chaque essai, une observation visuelle est effectuée sur la double émulsion, sur la suspension de microsphères après évaporation du solvant et enfin sur le lyophilisat.

Lors des essais préliminaires, une analyse de la forme des microsphères est réalisée au microscope optique et au grossissement fois 20 (Nikon Eclipse E400).

L'analyse de la forme des microsphères est réalisée par microscopie électronique à balayage (MEB). Afin d'intégrer les données sur la morphologie des microsphères formées dans le plan d'expériences, un barème a été défini. La notation est la suivante :

1 = Microsphères très poreuses

2 = Microsphères peu poreuses

3 = Microsphères lisses non poreuses

L'analyse de la taille et de la répartition granulométrique des microsphères réalisées est opérée par granulométrie laser en voie humide. Chaque lyophilisat est reconstitué dans de l'eau. L'eau permet de remettre en suspension les microsphères de PLGA sans les solubiliser. Ensuite trois analyses granulométriques par diffraction laser sont réalisées. Une première analyse est réalisée sur la suspension. Puis, une deuxième analyse est effectuée sous ultrasons afin de casser les agrégats si ils sont présents. Enfin, une analyse après une minute de repos après les ultrasons est réalisée afin d'observer les phénomènes de ré agglomération s'ils sont présents. Chaque répartition granulométrique est représentée sous la forme d'une courbe volume (%) en fonction de la taille (µm). L'obscurité de l'échantillon doit se situer aux alentours de 5 à 10% afin d'avoir un bon seuil de détection tout en évitant les phénomènes de diffraction multiple.

Ces deux dernières analyses sont sous traitées à L'ICMCB (Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux) sous la direction de Monsieur Jean Louis Bobet. 50 mg d'échantillon par analyse sont nécessaires.

L'humidité résiduelle est déterminée par une analyse au Karl fisher (Metler Toledo V30 Volumetric KF Titrator). Il n'y a pas de consensus sur le taux d'humidité résiduelle à ne pas dépasser.

L'estimation du temps au-delà duquel le solvant est complètement évaporé a été faite de manière empirique. Elle a été réalisée par pesée de la double émulsion avant et après évaporation du solvant, en se basant sur la densité du dichlorométhane de 1.33g/mL. Le calcul est le suivant :

$$\begin{aligned} & \text{Masse double émulsion avant la phase d'évaporation} \\ & - \text{Masse de la suspension après évaporation du solvant} \\ & = \text{Volume de dichlorométhane ajouté dans la PO} \times 1.33 \end{aligned}$$

Un dernier test est le test de reconstitution des lyophilisats fabriqués. Les résultats découlent directement des résultats de l'analyse granulométrique en voie liquide. En effet, ce test permet de

voir si une fois redispersées dans de l'eau, les microsphères restent agglomérées ou non. En pratique, le personnel soignant n'appliquera pas d'ultrasons pour casser les agrégats donc la remise en suspension doit pouvoir se faire correctement sans l'effet de la sonication.

Le Tableau 12 résume le matériel utilisé pour la réalisation des essais de microencapsulation.

Matériel	Marque/Modèle	N° équipement Bertin Pharma
Balances	<i>Mettler Toledo PB 3002-S 0.5g à 3100g, d = 0.01g</i>	DG/MES168
	<i>Mettler Toledo AG204 Max 210g, d = 0.1 mg</i>	DG/MES172
	<i>Mettler Toledo PR2002 Max 2100g, d=0.01g</i>	DA0043
Pipette	<i>1000 µL Gilson Pipetman® Classic</i>	DA0317
Ultra turrax	<i>Heidolph DIAX 900</i>	AGI01
Défloculeuse	<i>IKA WERK RW20</i>	DG/LIQ056
Agitateur pour pale d'agitation type hélice	<i>IKA WERK RW20</i>	DG/LIQ048
Plaques d'agitation magnétique	<i>Stuart</i>	DG/LIQ059
	<i>Stuart</i>	DG/LIQ060
	<i>Bibby</i>	DG/LIQ052
Lyophilisateur	<i>Telstar LyoBeta 15 (Logiciel LyoLogger V4.03)</i>	DG/SOL193
Centrifugeuse	<i>Jouan GR 4.11</i>	DA0195
Microscope optique	<i>Nikon Eclipse E400</i>	DG/MES151
Karl Fisher	<i>Metler Toledo V30 Volumetric KF Titrator</i>	DA0479
Sorbonne pour utilisation de solvants	<i>Geometra</i>	DA0273
Microscope électronique	Analyses sous traitées à l'Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux	
Granulomètre avec diffraction laser		

Tableau 12 : Matériels

IV.2.2.4. Essais préliminaires

Lors des essais préliminaires, le procédé utilisé pour former des microsphères de PLGA est la technique de l'évaporation de solvant basée sur la double émulsion e/h/e telle que décrite par *Chen et al* [69]. Le Tableau 13 reprend les différentes formules fabriquées lors de ces essais préliminaires. Le lot D160138 a une formule identique au lot D160085. Le lot D160149 a une formule identique au lot D160086. Lors de l'essai numéro un, chaque volume a été multiplié par cinq par rapport aux volumes indiqués.

Suite au premier essai, quelques paramètres du procédé de fabrication sont modifiés afin d'améliorer le rendement, la taille et la forme des microsphères formées. Le ratio volume phase organique / phase interne aqueuse a ainsi été augmenté à 33 : 1. Afin de former l'émulsion primaire, la vitesse d'agitation du rotor stator est augmentée à 11500 tr/min. Le ratio volume phase externe aqueuse / émulsion primaire est augmenté à 44 : 1. Enfin, trois différents appareils d'agitation sont utilisés pour former l'émulsion secondaire. Il s'agit de l'agitateur magnétique, de la défloculeuse et de l'ultraturrax. Ces modifications concernent le second essai.

Le troisième essai a pour objectif l'investigation d'une potentielle interaction entre le PVP et le NaCl. Pour cela, les lots D160150 et D160179 ont été fabriqués. Le lot D160150 présente une formulation contenant du PVA et du NaCl. Le lot D160179 présente une formulation contenant du PVP mais pas de NaCl. Cet essai a également pour objectif d'optimiser le cycle de lyophilisation.

Le cycle de lyophilisation des lots fabriqués lors des essais numéros un et deux a été inspiré des travaux de Jeffrey L. Cleland et collaborateurs [70] ainsi que des travaux de W. Abdelwahed et collaborateurs [71]. Il est résumé dans le Tableau 14. La durée totale du cycle est de 27h45. Le cycle optimisé de lyophilisation est disponible dans le Tableau 15. La durée totale de ce cycle est de 33 heures 45 minutes.

n° essai	n° lot	Phase aqueuse interne	Phase organique			Formation émulsion primaire	Phase aqueuse externe		Formation émulsion secondaire
		Volume eau PPI	Type PLGA + concentration (m/v)	Volume dichlorométhane	Type stabilisant + concentration (m/v)	Conditions opératoires	Type stabilisant + concentration	Volume eau PPI	Conditions opératoires
1	D160085	5 mL	RG 503H, 6%	25mL	Montane® 80, 1% m/v	Ultra turrax, 8000rpm pendant 2 minutes	Montanox® 80, 0,5% PVP K17, 6%	150mL	Agitation magnétique, 1300rpm pendant 4 minutes
	D160086	5mL	RG 503H, 6%	25mL	N/A	Ultra turrax, 8000 rpm pendant 2 minutes	NaCl, 5% PVP K17, 4%	150mL	Agitation magnétique, 1300rpm pendant 4 minutes
2	D160138/A	0.3mL	RG 503H, 6%	10mL	Montane® 80, 1% m/v	Ultra turrax, 11500 rpm pendant 2 minutes	Montanox® 80, 0,5% PVP K17, 6%	450mL	Agitation magnétique, 1300rpm pendant 4 minutes
	D160138/B								Défloculeuse, vitesse intermédiaire pendant 2 minutes
	D160138/C								Ultra turrax, 8000 rpm pendant 1 minute
	D160149/A	0.3mL	RG 503H, 6%	10mL	N/A	Ultra turrax, 11500 rpm pendant 2 minutes	NaCl, 5% PVP K17, 4%	450mL	Agitation magnétique, 1300rpm pendant 4 minutes
	D160149/B								Pâle d'agitation type hélice, vitesse intermédiaire pendant 2 minutes
	D160149/C								Ultra turrax, 8000 rpm pendant 1 minute
3	D160150	0.3mL	RG 503H, 6%	10mL	N/A	Ultra turrax, 11500 rpm pendant 2 minutes	NaCl, 5% PVA 4-88 4%	450mL	Ultra turrax, 8000 rpm pendant 1 minute
	D160179	0.3mL	RG 503H, 6%	10mL	N/A	Ultra turrax, 11500 rpm pendant 2 minutes	PVP K17, 4%	450mL	Ultra turrax, 8000 rpm pendant 1 minute

Tableau 13 : Résumé des lots fabriqués lors des essais préliminaires

N/A = Non applicable

Etape		Température	Pression	Durée
Congélation	Rampe	-55°C	PAtm	1h
	Plateau	-55°C	PAtm	4h45
Vide de chambre	-	-	0.33 mbar	-
Dessiccation primaire	Rampe	-20°C	0.33 mbar	2h
	Plateau	-20°C	0.33 mbar	12h
Dessiccation secondaire	Rampe	20°C	0.33 mbar	2h
	Plateau	20°C	0.33 mbar	6h
Température étagères	-	20°C	-	-

Tableau 14: Paramètres de lyophilisation utilisés pour les essais 1 et 2

Etape		Température	Pression	Durée
Congélation	Rampe	-55°C	PAtm	1h
	Plateau	-55°C	PAatm	4h45
Vide de chambre	-	-	0.33 mbar	-
Dessiccation primaire	Rampe	-10°C	0.33 mbar	2h
	Plateau	-10°C	0.33 mbar	12h
Dessiccation secondaire	Rampe	20°C	0.33 mbar	2h
	Plateau	20°C	0.33 mbar	12h
Température étagères	-	5°C	-	-

Tableau 15 : Paramètres de lyophilisation utilisés pour l'essai 3 et retenus pour le plan d'expériences

IV.2.2.5. Plan d'expériences

Certains paramètres du procédé d'évaporation de solvant ont été fixés suite aux résultats des essais préliminaires. Ainsi les volumes des différentes phases ainsi que les appareils d'agitation ont été fixés. Le volume de la PIA est de 0.3mL. Le volume de la PO est de 10mL. Enfin, le volume de la PEA est de 150mL. L'émulsion primaire est réalisée à l'aide d'un ultraturrax, à vitesse 11500 rpm pendant deux minutes. L'émulsion secondaire est réalisée à l'aide d'un ultraturrax, à vitesse 8000rpm pendant une minute. La préparation de la PEA doit être réalisée au début de la journée si le PVA est sélectionné comme agent principal stabilisant, afin de laisser 4h d'agitation pour que la phase revienne à température ambiante après chauffage. Le Montanox® 80 s'il est présent dans la formule avec le PVA doit être ajouté lorsque la solution est revenue à température ambiante et dans tous les cas en dernier lieu car il peut « mousser ». Les suspensions finales sont conditionnées dans un flacon possédant une large ouverture et stockées au congélateur (-20°C) en attente de l'étape de lyophilisation. Les lyophilisats produits sont stockés entre 2 et 8°C. Les nouveaux paramètres de lyophilisation suite aux essais préliminaires sont décrits dans le Tableau 15.

Le plan d'expériences de criblage ainsi initié a pour objectif d'évaluer l'impact des paramètres de formulation sur la taille et la forme des microsphères blanches de PLGA créées. Si plusieurs formules permettent d'obtenir des microsphères blanches de PLGA répondant au cahier des charges, la formule sélectionnée sera la plus simple, donc contenant le moins d'excipients, avec un procédé de fabrication le plus simple également donc ayant le moins d'étapes possibles.

Le plan d'expériences qui a été élaboré contient trois facteurs à deux niveaux et un facteur à cinq niveaux. Ils sont détaillés dans le Tableau 16. Il permet ainsi d'étudier l'impact du type de polymère, de la présence ou non d'agent stabilisant dans la phase organique, du type de stabilisant dans la phase externe aqueuse et sa concentration et de la présence ou non d'un deuxième agent stabilisant dans la phase externe aqueuse, sur la taille et la forme des microsphères blanches de PLGA.

	Facteur	Nombre Niveaux	Niveaux
U1	Type PLGA	2	RG 503 H RG 503
U2	Stabilisant PO	2	Montane 80 Aucun
U3	Concentration PVA ou PVA dans PEA	2	2 4
			PVA PVA - NaCl 5%
U4	Stabilisant(s) PEA	5	PVA - Montanox 80 0.5% PVP PVP- Montanox 80 0.5 %

Tableau 16 : Plan d'expériences : Domaine expérimental

Cinq réponses sont intégrées dans le plan d'expériences. Ces réponses sont le diamètre médian des microparticules avant et pendant ultrasons, l'étalement de la répartition granulométrique avant et pendant ultrasons, et enfin la morphologie des microparticules. Au diamètre médian exprimé en μm , 50% des microsphères auront un diamètre plus faible. Il sera nommé $D(v;0.5)$. L'étalement est représenté par $D(v;0.9)$ et $D(v;0.1)$. A la valeur $D(v;0.1)$ exprimée en μm , 10% des microsphères auront un diamètre plus petit. A la valeur $D(v;0.9)$ exprimée en μm , 10% des microsphères auront un diamètre plus grand. La Figure 14 est un schéma explicatif des $D(v;0.5)$, $D(v;0.9)$ et $D(v;0.1)$.

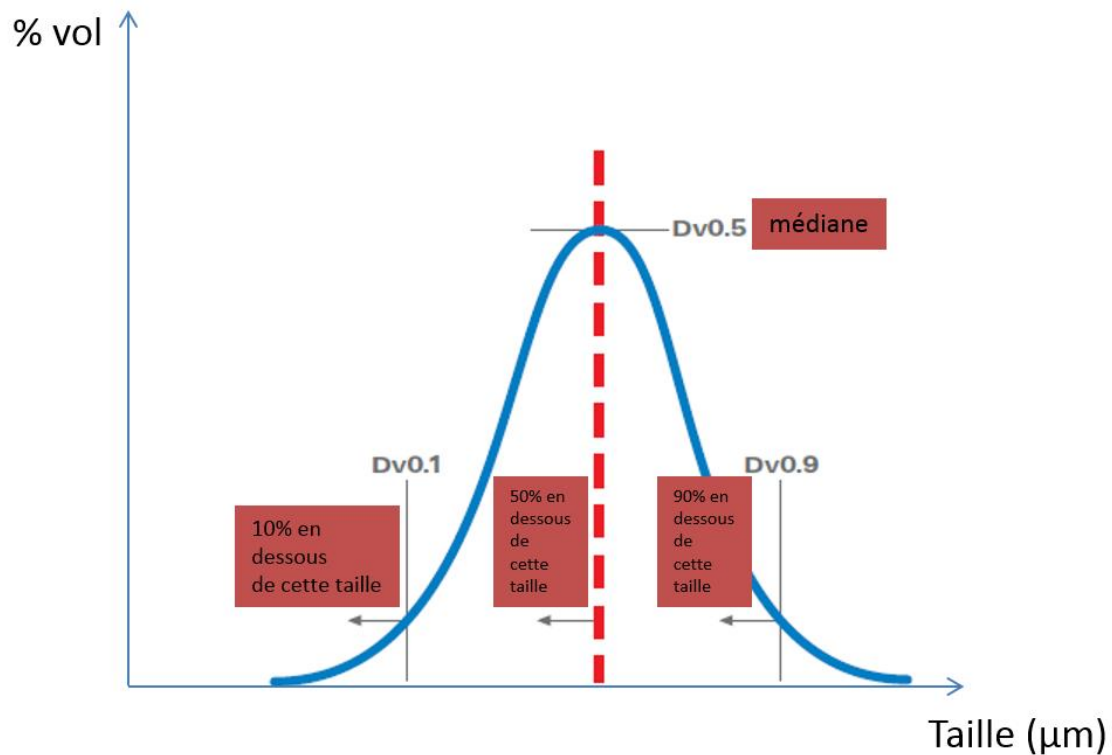


Figure 14 : $D(v;0.5)$, $D(v;0.9)$ et $D(v;0.1)$

Le plan d'expériences est créé à l'aide du logiciel NemrodW®. Le modèle est le suivant :

$$Y = b_0 + b_{1A} * (X_{1A}) + b_{2A} * (X_{2A}) + b_{3A} * (X_{3A}) \\ + b_{4A} * (X_{4A}) + b_{4B} * (X_{4B}) + b_{4C} * (X_{4C}) \\ + b_{4D} * (X_{4D})$$

Le logiciel a sélectionné 16 formules différentes. Elles sont disponibles dans le Tableau 17. Une de ces formules doit être réalisée trois fois pour mesurer l'erreur expérimentale. 18 essais sont donc à réaliser au total. Les essais sont randomisés afin d'éviter tout biais. Les essais triplés (encadrés dans le tableau) sont réalisés en début, milieu et fin du plan d'expériences. Pour chaque expérience, un numéro de lot est attribué. Trois lots par jour sont réalisés sous sorbonne, au sein du laboratoire analytique de Bertin Pharma, sur le site d'Artigues-près-Bordeaux.

N° Expérience	Randomisation	N° lot	Type PLGA	Stabilisant dans PO	Stabilisant dans PEA	Concentration PVP ou PVA dans PEA (%)
1	8	D160211	RG 503 H	Montane 80	PVA	2
2	2	D160204	RG 503	Aucun	PVA	4
3	5	D160208	RG 503 H	Montane 80	PVA – NaCl 5%	2
4	9	D160232	RG 503	Aucun	PVA – NaCl 5%	4
5	4	D160207	RG 503 H	Montane 80	PVA – Montanox 80 0.5%	4
6	6	D160209	RG 503	Aucun	PVA – Montanox 80 0.5%	2
7	16	D160240	RG 503 H	Montane 80	PVP	4
8	17	D160241	RG 503	Aucun	PVP	2
9	15	D160239	RG 503 H	Aucun	PVP- Montanox 80 0.5 %	2
10	18	D160242	RG 503	Montane 80	PVP- Montanox 80 0.5 %	4
18	7	D160210	RG 503	Montane 80	PVP- Montanox 80 0.5 %	4
17	1	D160201	RG 503	Montane 80	PVP- Montanox 80 0.5 %	4
11	13	D160237	RG 503 H	Aucun	PVA – Montanox 80 0.5%	2
12	11	D160235	RG 503	Montane 80	PVA – Montanox 80 0.5%	4
13	14	D160238	RG 503 H	Aucun	PVA – NaCl 5%	4
14	10	D160234	RG 503	Montane 80	PVA – NaCl 5%	2
15	3	D160206	RG 503 H	Aucun	PVA	4
16	12	D160236	RG 503	Montane 80	PVA	2

Tableau 17 : Plan d'expériences : Les formules sélectionnées

Le premier jour, trois lots sont réalisés. L'étape d'évaporation du solvant durant au minimum 18h, l'étape de rinçage est effectuée le jour suivant. Aucune double émulsion n'est réalisée le vendredi car cela impliquerait d'effectuer le rinçage le lundi soit trois jours après l'élaboration de la double émulsion, or la méthode utilisée doit être la plus reproductible possible. La Figure 15 représente le diagramme de Gant schématisant la planification des essais se rapportant au plan d'expériences. Le temps total pour la réalisation des essais est de 13 jours ouvrés.

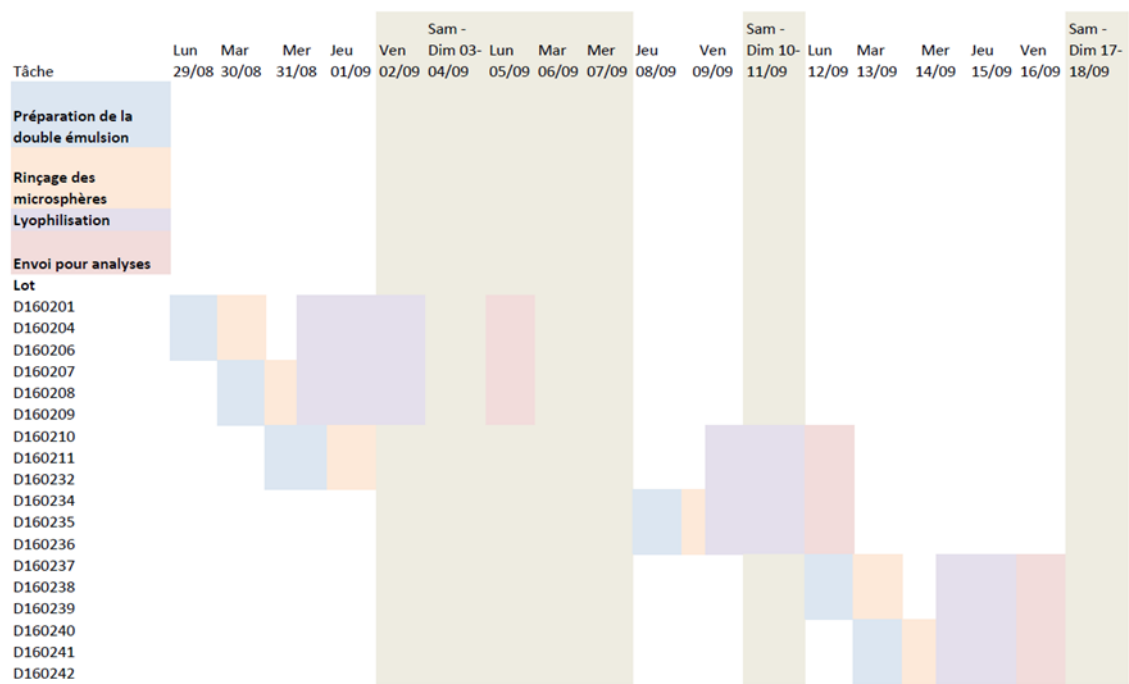


Figure 15 : Plan d'expériences : Diagramme de Gant

IV.3. Résultats

IV.3.1. Résultats des essais préliminaires

IV.3.1.1. Résultats de l'essai 1

Pour chaque lot, une précipitation du polymère est observée. Celui-ci adhère aux parois du bécher. Les microsphères sont peu ou pas formées. Le Tableau 18 représente les photos prises des béchers contenant les lots 160085 et D160086 avant et après l'évaporation du dichlorométhane. A la fin des 18h d'évaporation du dichlorométhane et du processus de rinçage, la poudre de microparticule du lot D160086 n'a pas pu être récupérée après centrifugation. Une perte importante est observée.

Après lyophilisation du lot D160185, la masse sèche récupérée pèse 33mg, soit un rendement de 2.2 %.

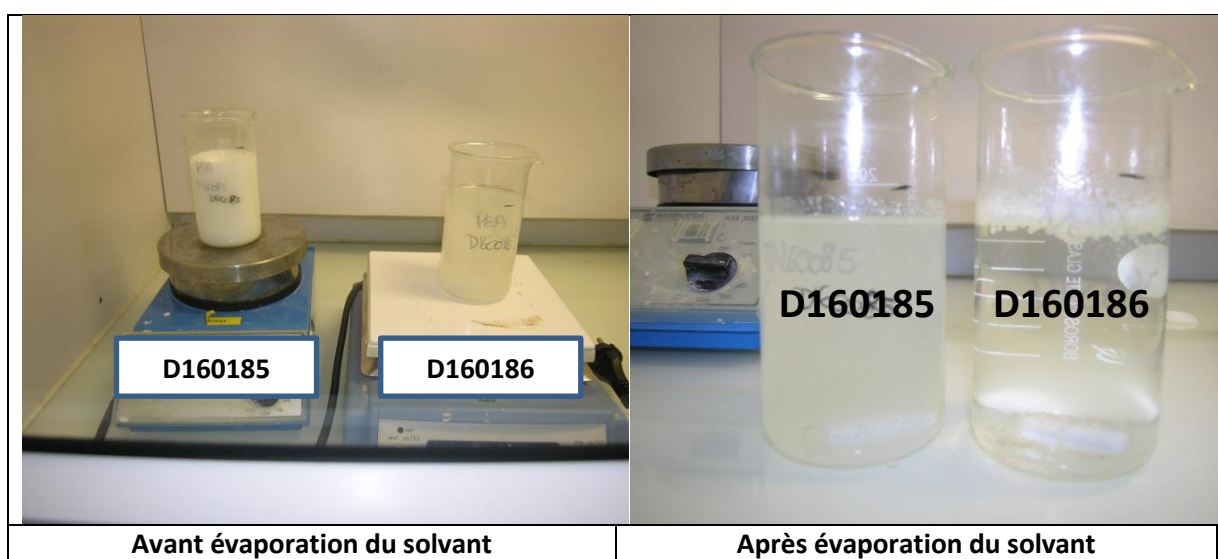


Tableau 18 : Lots D160185 et D160186 avant et après l'évaporation du solvant

IV.3.1.2. Interprétation de l'essai 1 :

Le Tableau 19 permet de comparer les conditions mises en œuvre pour l'essai 1 avec celles décrites dans la littérature.

	Paramètre étudié	Paramètres initialement utilisés [69]	Paramètres des procédés décrits dans les publications scientifiques [72]–[77]
Emulsion primaire	Concentration du polymère dans la PO	6g / 100mL	En moyenne : 8g / 100mL
	Ratio volume PO / PIA	5 : 1	En moyenne : 31.5 : 1
	Type d'agitateur et vitesse	Ultraturrax 8000 rpm pendant 2 minutes	• Ultraturrax - De 11000 à 20000 rpm • Vortex • Sonication
Emulsion secondaire	Ratio volume émulsion primaire/ PEA	1 : 5	En moyenne : 1 : 103.5
	Type d'agitateur et vitesse	Agitation magnétique 1300 rpm pendant 4 minutes	• Ultraturrax - De 3500 à 8000 rpm • Agitation magnétique • Ultra sonication

Tableau 19 : Revue de la littérature : l'émulsion primaire

La concentration du polymère dans la PO initialement choisie se situe dans la moyenne des concentrations en polymère retrouvées dans les différentes publications scientifiques. Des publications scientifiques relatent l'importance de l'utilisation d'un faible volume de PIA [49],[55]. D'une part, avec un faible volume de PIA, la taille des particules formées diminue et leurs formes est plus lisse et moins poreuse. D'autre part, un large volume de PEA conduit à une formation plus rapide de microsphères par le polymère, et de faible porosité mais entraînerait également une augmentation de la taille des particules [73].

Comme expliqué précédemment, l'augmentation de la vitesse d'agitation lors des émulsions primaires et secondaires conduit généralement à la formation de microsphères plus petites. Par ailleurs, plus le diamètre de l'agitateur est important, plus le diamètre des microsphères formées sera faible [78].

Même si l'ultraturrax peut être utilisé comme appareil d'agitation pour former l'émulsion secondaire, celui-ci peut « casser » l'émulsion primaire initialement formée. Cet appareil peut donc être une alternative à l'agitation magnétique initialement utilisée, mais à une vitesse minimale. Un appareil d'agitation intermédiaire tel qu'une défloculeuse peut également être testée afin d'évaluer son impact sur la taille et la forme des microsphères réalisées.

IV.3.1.3. Résultats de l'essai 2 :

La Figure 16 représente les suspensions de microsphères obtenues après évaporation du solvant, pour le lot D160138. Il n'est pas observé de précipitation de polymère, ni d'adhérence du polymère aux parois du bécher. La suspension lot D160138/A présente des particules grossières visibles en suspension. La suspension du lot D160138/C est visuellement homogène, opaque blanche.

En revanche, le lot D160149 ainsi que ses 3 sous lots présentent un début de solidification du polymère à l'interface liquide/air sans formation de microsphères, cela après 5 minutes d'agitation magnétique afin d'évaporer le solvant. Le phénomène observé est identique à celui observé sur le lot D160085.



Figure 16 : Lots D160138/A,B et C après évaporation de solvant

Le rendement des trois sous lots du lot D160138 après lyophilisation est disponible dans le Tableau 20. Le sous lot D160138/A obtient le meilleur rendement avec une valeur de 99.9%.

	Masse théorique	Masse retrouvée	Rendement
D160138/A	200 mg	66 mg	33 %
D160138/B	200 mg	113.2 mg	56.6 %
D160138/C	200 mg	199.7 mg	99.9 %

Tableau 20 : Rendement des lots D160138/A, B et C

Les lots D160138/A et C ont été analysés en microscopie optique, les photos prises lors de ces analyses sont disponibles dans la Figure 17. Pour chacun des lots, des sphères sont effectivement formées.

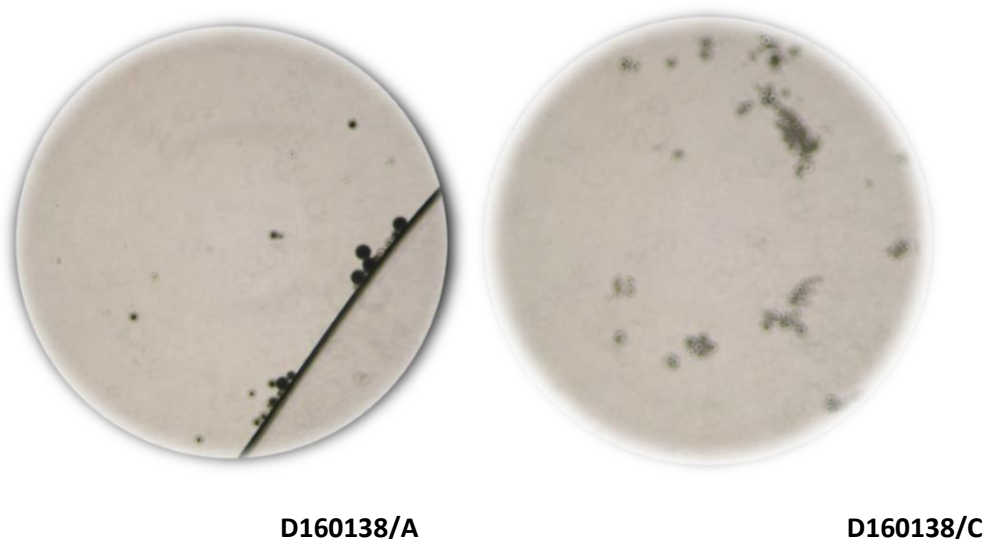


Figure 17: Microscopie optique des lots D160138/A et C, grossissement x20

Visuellement, les lyophilisats sont légèrement pâteux. Ils présentent une humidité résiduelle moyenne de 1.49%. Les échantillons envoyés en analyse MEB sont inexploitable dus à cette humidité résiduelle.

IV.3.1.4. Interprétation de l'essai 2

La modification des conditions opératoires (diminution du volume de la PIA, augmentation du volume de la PEA et augmentation de la force d'agitation lors de l'élaboration de l'émulsion primaire), s'est révélée concluante pour le lot D160138. Plus particulièrement, le lot D160138/C obtient un excellent rendement. L'utilisation de l'ultraturax à une vitesse minimale afin d'élaborer la double émulsion permet non seulement d'obtenir un bon rendement mais aussi d'obtenir des microsphères visuellement de forme adéquate (ronde) et de même taille lorsqu'elles sont observées au microscope optique. Les lyophilisats obtenus du lot D160138 présentent une humidité résiduelle à priori acceptable. Cependant elle doit être améliorée au vu de l'impossibilité d'interpréter les résultats de l'analyse en microscopie électronique à balayage. Une optimisation du cycle de lyophilisation sera réalisée en augmentant la température lors du séchage primaire, augmentant la durée du plateau du séchage secondaire, en mettant la température des étagères à 5°C pour une meilleure conservation des lyophilisats, et enfin en conservant les lyophilisats dans une double poche avec un sachet déshydratant.

Suite au nouvel échec de fabrication du lot D160149, deux interprétations sont possibles. Soit l'utilisation de PVP seul concentré à 6% dans la PEA et servant de stabilisant n'est pas suffisant. Ce procédé nécessiterait donc l'utilisation d'autres agents stabilisants tels que l'association Montane80/Montanox80 qui est utilisée dans la formulation des lots D160085 et D160138. Soit une interaction néfaste a lieu entre le PVP et le NaCl, les deux excipients utilisés dans la PEA pour fabriquer les lots D160149 et D180086. Cette investigation sur une potentielle interaction entre le PVP et le NaCl a été l'objet de l'essai 3.

IV.3.1.5. Résultats de l'essai 3

Concernant le lot D160150, durant les premières minutes d'évaporation du solvant, après avoir réalisé la double émulsion, aucune précipitation du polymère n'est observée. Après 18h d'évaporation, la suspension est homogène, légèrement opaque. Concernant le lot D160179, durant les premières minutes d'évaporation, aucune solidification non désirable du polymère n'est observée. Après 18h d'évaporation, la suspension est homogène, légèrement opaque.

Les suspensions de microsphères obtenues ont été lyophilisées suivant les nouveaux paramètres. Les lyophilisats ont une apparence moins dense et moins pâteuse. Après analyse en Karl Fisher, ils présentent une humidité résiduelle moyenne de 0.99%, soit une baisse de 0.5% par rapport au lot D160138. Le lot D160179 est envoyé à l'ICMCB (Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux) pour que des analyses en microscopie électronique et granulométrie laser en voie humide soit réalisées.

La Figure 18 et la Figure 19 représentent respectivement les images en MEB et la répartition granulométrique du lot D160179.

Les microsphères ont un aspect lisse, avec une certaine hétérogénéité de taille. Les plus grosses particules avoisinent les 25 microns. Les ultrasons ont permis de détruire les agrégats et de décaler la courbe granulométrique vers la gauche.

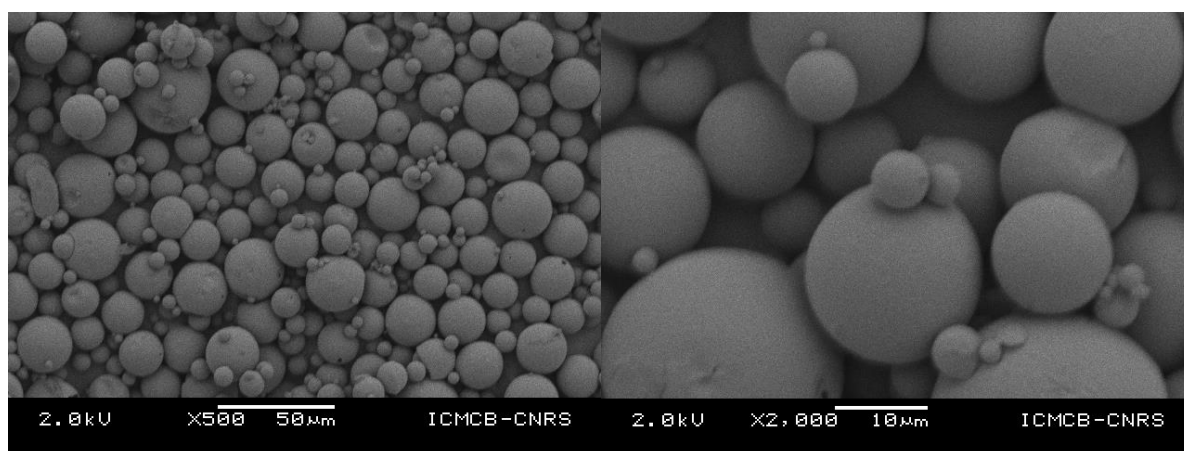


Figure 18 : Images en microscopie électronique à balayage du lot D16179

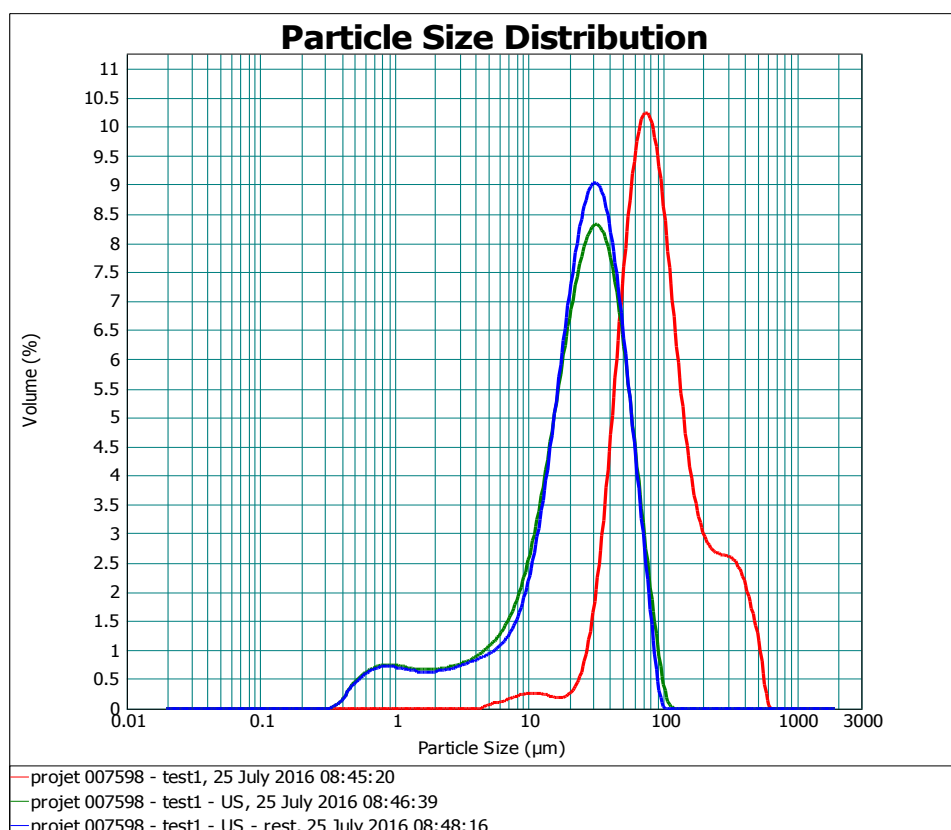


Figure 19 : Répartition granulométrique du lot D160179. US = Ultrasons, US – rest = repos d’une minute après sonication

IV.3.1.6. Interprétation de l’essai 3

Une interaction entre le PVP et le NaCl a été effectivement mise en évidence. En effet, les formules de microsphères de PLGA contenant uniquement du PVP dans la PEA ou du PVA avec du NaCl dans la PEA ont permis la création de microsphères blanches, sans précipitation du PLGA durant le procédé de fabrication. Le mécanisme de l’interaction n’est cependant pas encore élucidé.

Une optimisation des cycles de lyophilisation a été réalisée lors de ce troisième essai. Les lyophilisats obtenus, présentant une plus faible humidité résiduelle, ont pu être analysés en MEB.

Bien qu’ayant remis en suspension le lyophilisat du lot D160179 afin d’effectuer une analyse granulométrique en voie humide, des agrégats sont présents. Ils ont été mis en évidence car la taille moyenne des microsphères diminue lorsque la suspension est soumise aux ultrasons ce qui indique que des agrégats ont été éliminés lors des ultrasons. Avant ultrasons, les particules détectées font environ 100μm de diamètre. En réel les microsphères de PLGA non agglomérées ont une taille inférieure à 100μm ce qui est acceptable pour une injection en IM ou SC. En pratique, lors de la reconstitution du lyophilisat par le personnel soignant, il y a un risque d’avoir des microsphères agglomérées, plus grosses, pouvant risquer de boucher l’aiguille de la seringue. En revanche, une fois les agrégats éliminés, ceux-ci ne réapparaissent pas après le passage aux ultrasons. Afin d’améliorer cette reconstitution, l’ajout d’excipients stabilisants peuvent favoriser une meilleure remise en suspension des microparticules (se référer au Tableau 4). En particulier, les tensioactifs non ioniques tels que les polysorbates 20 ou 80 présents dans la PEA diminuent l’adsorption et/ou l’agrégation des protéines sur les surfaces hydrophobes provoquée par l’agitation. Ils n’ont pas été utilisés lors de cet essai 3.

IV.3.1.7. Résultats plan d'expériences

Chaque réponse a été intégrée dans le plan d'expériences et compilée dans le Tableau 21.

N°Expérience non randomisée	N° lot	D (v;0.5) avant ultrasons	Etalement avant ultrasons D (v;0.9) - D (v;0.1)	D (v;0.5) durant ultrasons	Etalement durant ultrasons D (v;0.9) - D (v;0.1)	Morphologie
		µm	µm	µm	µm	
1	D160211	16.462	38.482	14.938	29.290	1
2	D160204	15.676	68.626	14.615	40.780	2
3	D160208	13.292	218.390	9.350	157.629	3
4	D160232	33.117	92.331	26.930	83.187	3
5	D160207	31.676	135.987	26.836	141.462	3
6	D160209	27.350	70.550	21.591	40.245	1
7	D160240	237.900	472.893	81.699	178.155	3
8	D160241	35.617	517.131	18.779	27.849	1
9	D160239	29.168	69.180	19.680	32.706	2
10	D160242	86.905	739.849	20.047	62.831	3
18	D160210	43.693	396.762	21.010	48.053	3
17	D160201	37.481	595.074	19.164	47.038	3
11	D160237	18.276	31.981	16.881	27.264	2
12	D160235	66.662	228.657	50.663	198.822	2
13	D160238	29.094	95.201	23.014	69.057	1
14	D160234	68.059	203.531	9.511	69.841	3
15	D160206	16.683	77.184	15.004	45.950	1
16	D160236	26.016	153.741	17.105	38.345	3

Tableau 21 : Résultats des analyses en MEB et granulométrie laser

Les figures 20 à 24 représentent les résultats du plan d'expériences pour chacune des réponses, sous deux formes différentes. La forme de gauche représente l'impact du changement d'un niveau sur la réponse avec :

Facteurs		Niveaux	
B1	Type de PLGA	1	RG 503 H
		2	RG 503
B2	Stabilisant PO	1	Montane 80
		2	Aucun
B3	Concentration PVA ou PVA dans PEA	1	2
		2	4
B4	Stabilisant(s) PEA	1	PVA
		2	PVA - NaCl 5%
		3	PVA - Montanox 80 0.5%
		4	PVP
		5	PVP- Montanox 80 0.5 %

Tableau 22 : Lecture des résultats du plan d'expériences

Afin de lire correctement les schémas de gauche, il faut comprendre que par exemple b1/2-1 signifie que concernant le facteur 1 autrement dit le type de PLGA, le fait de passer du niveau 1 au niveau 2, autrement dit du Resomer® RG 503H au RG 503, engendre soit une diminution/une augmentation de la réponse.

Réponse 1 : Le diamètre médian des microparticules avant ultrasons : $D(v;0.5)$

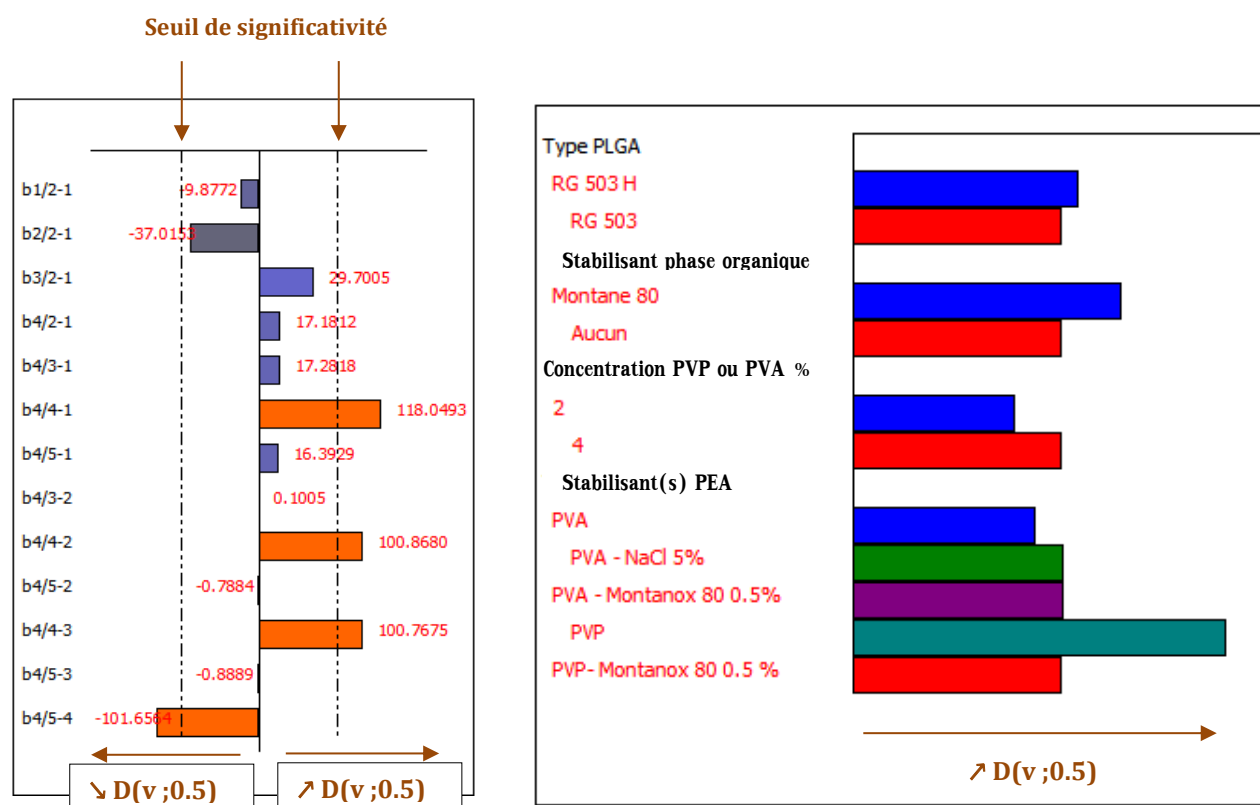


Figure 20 : Réponse 1 : Le diamètre médian des microparticules avant ultrasons : $D(v;0.5)$

Réponse 2 : Le diamètre médian des microparticules pendant les ultrasons : $D(v;0.5)$

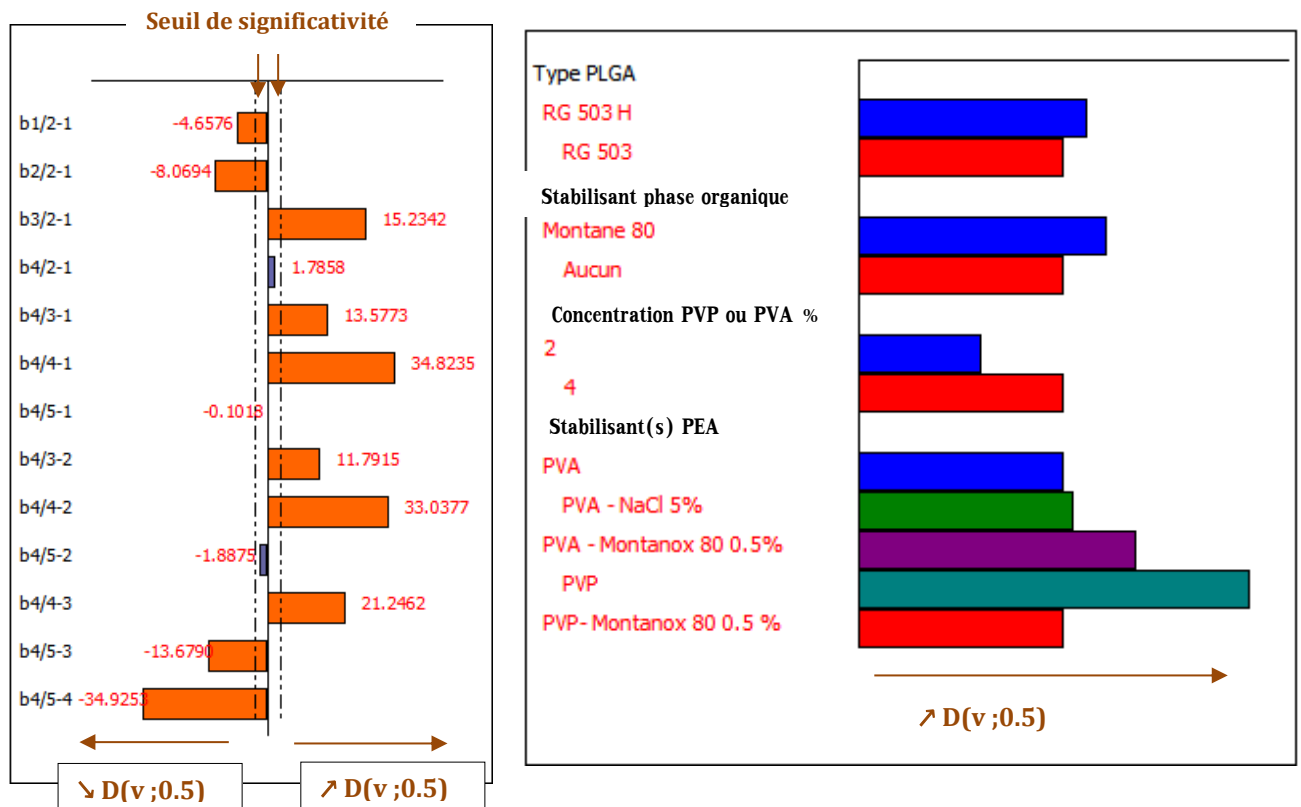


Figure 21 : Réponse 2 : Le diamètre médian des microparticules pendant les ultrasons : $D(v;0.5)$

Réponse 3 : L'étalement de la répartition granulométrique avant ultrasons : $D(v;0.9) - D(v;0.1)$

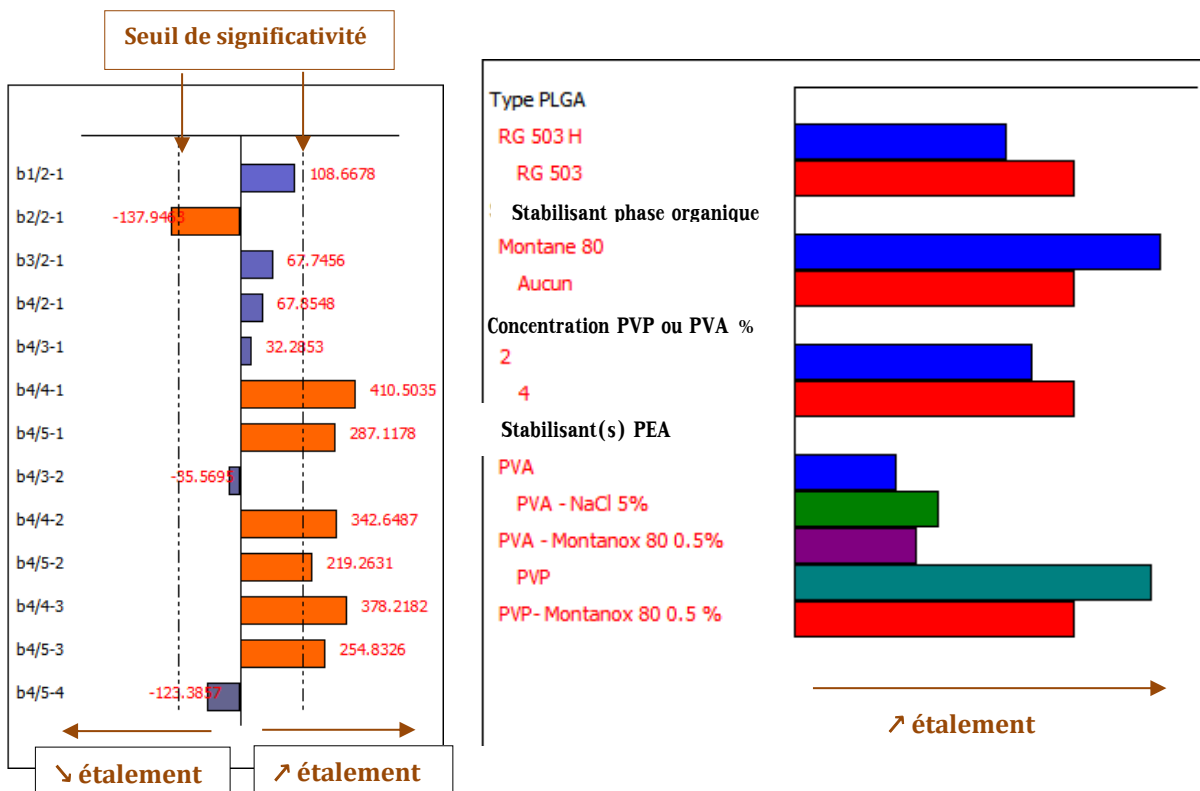


Figure 22 : Réponse 3 : L'étalement de la répartition granulométrique avant ultrasons : $D(v;0.9) - D(v;0.1)$

Réponse 4 : L'étalement de la répartition granulométrique pendant les ultrasons : D (v;0.9) - D (v;0.1)

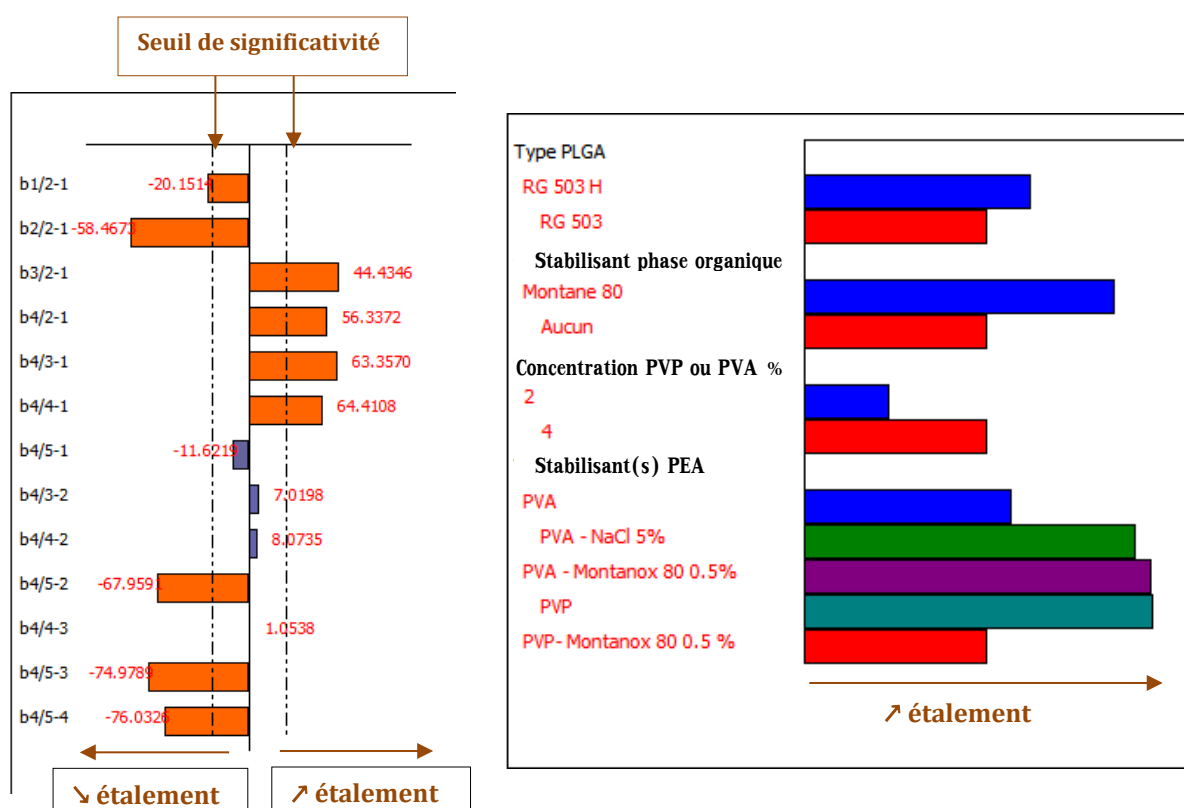


Figure 23 : Réponse 4 : L'étalement de la répartition granulométrique pendant les ultrasons : D (v;0.9) - D (v;0.1)

Pour compléter ces résultats et après lecture des courbes représentant la répartition granulométrique de chacun des lots, les formulations ayant un étalement supérieur à 100 µm sont celles des lots D160207, D160208, D160235 et D160240. Les formules ayant un étalement compris entre 50 µm et 100 µm sont celles des lots D160232, D160234, D160238 et D160242. Les formules ayant un étalement inférieur à 50 µm sont celles des lots D160201, D160204, D160206, D160209, D160210, D160211, D160236, D160237, D160239 et D160241.

Les analyses de granulométrie en voie humide ont également permis de détecter des agrégats dans les suspensions reconstituées de microsphères blanches de PLGA. Ils sont plus ou moins importants et disparaissent plus moins après passage aux ultrasons. Le Tableau 23 résume ces observations au niveau des courbes granulométriques disponibles en Annexe 5.

Présence d'agrégats supprimés après sonication sans réagglomération	D160204 – D160206 – D160211 – D160237 – D160238 – D160241
Présence d'agrégats supprimés après sonication avec réagglomération	D160201 – D160209 – D160210 – D160236 – D160239 – D160240 – D160242
Présence d'agrégats résiduels après sonication	D160208 – D160234
Présence de deux populations de taille de microsphères	D160207 – D160232 – D160235 – D160238
Les 3 courbes se superposent	/

Tableau 23 : Résultats remise en suspension - Analyse de granulométrie en voie humide

Réponse 5 : La morphologie des microparticules

L'intégralité des résultats des analyses en MEB et par granulométrie laser en voie humide est disponible en annexe 4.

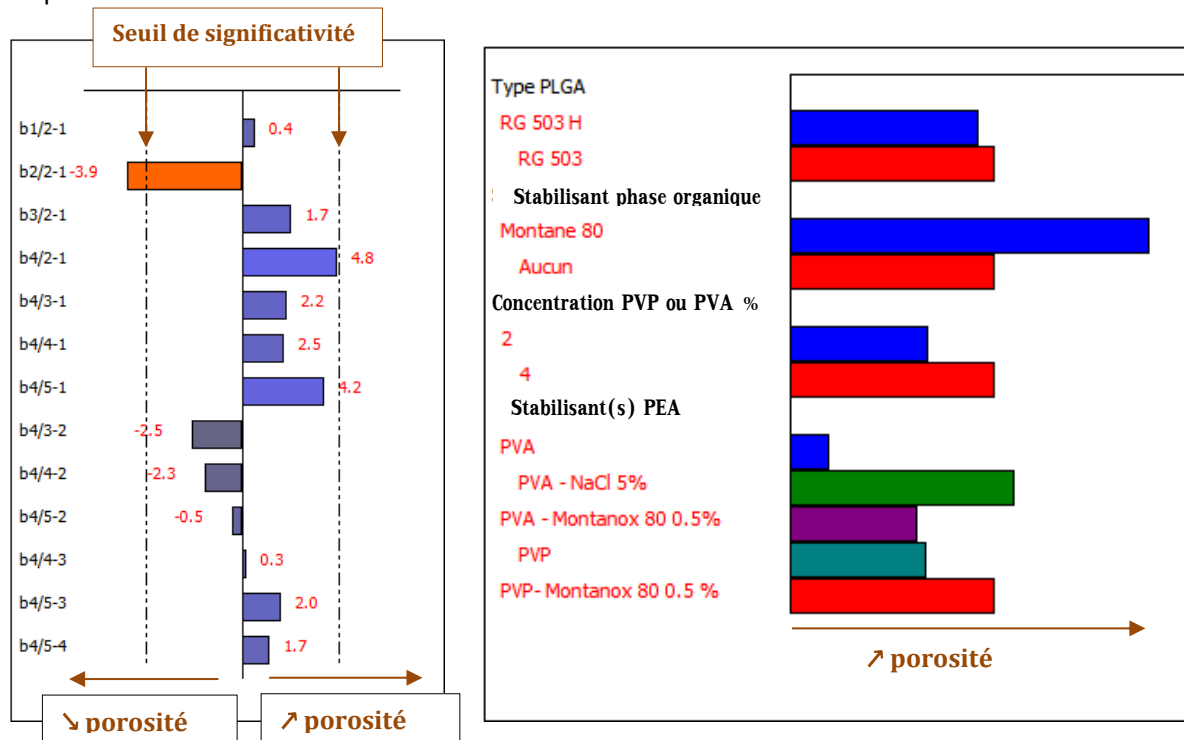


Figure 24 : Réponse 5 : La morphologie des microparticules

IV.3.1.8. Interprétation du plan d'expériences

Les essais triplés permettent de déterminer l'erreur expérimentale. Avant le passage aux ultrasons de ces trois lots, les résultats des analyses de granulométrie laser en voie humide sont plutôt éloignés avec un diamètre médian variant entre 37 μm et 87 μm . La mise sous ultrasons des trois lots triplés engendre un rapprochement des résultats de granulométrie laser, avec un diamètre médian variant seulement de 19 μm à 21 μm . Ces essais, en complément des données de chaque expérience, ont permis de définir le seuil de significativité de chaque réponse. Ainsi l'impact des paramètres testés est réduit pour les réponses 1 et 3 (faible sensibilité, réponses n'atteignant pas le seuil de significativité – se référer aux figures 20 à 22). Cet impact est plus significatif concernant les réponses 2 et 4 (seuil de significativité atteint – se référer aux figures 21 et 23).

Les réponses étudiées dans le cadre du plan de criblage sont discutées ci-après.

Réponse 1 : Le diamètre médian des microparticules avant ultrasons : D (v;0.5)

Sur les 18 expériences réalisées, le diamètre médian des microsphères avant les ultrasons oscille entre 13 μm et 328 μm . Seul le lot D160240 ne répond pas au cahier des charges en ayant un diamètre médian bien supérieur à 100 μm .

Il n'y a pas d'impact significatif d'un changement entre le Resomer® RG 503 et 503H sur la taille des microsphères. La présence de Montane® 80 dans la PO ne réduit pas de manière significative la taille des microsphères. Il n'y a pas de changement significatif de la taille des microsphères lorsque la concentration en PVA ou PVP dans la PEA est modifiée passant de 2 % à 4 % ou l'inverse.

L'utilisation de PVP seul dans la PEA donne significativement des microsphères plus grosses par rapport aux autres choix de stabilisants en association ou non utilisés dans la PEA lors du plan d'expériences. Cette taille accroît en moyenne de 105 μm lorsque l'on utilise seulement le PVP dans la PEA. Les formules contenant une association de stabilisants dans la phase externe aqueuse sont équivalentes en terme de taille de microsphères formées (en moyenne 40 μm).

Réponse 2 : Le diamètre médian des microparticules pendant les ultrasons : D (v;0.5)

Sur les 18 expériences réalisées, le diamètre médian des microsphères sous l'effet de la sonication oscille entre 9 μm et 82 μm . Tous les diamètres médians des microsphères blanches de chaque lot ont diminué sous l'action des ultrasons, plus ou moins intensément selon les lots, ce qui suggère que des agrégats étaient présents au moment de la reconstitution des lyophilisats. Les lots suivants ont été les plus impactés par cette réduction de taille (différence de diamètre d'au moins 10 μm entre la valeur avant et après les ultrasons) :

- D160240
- D160241
- D160239
- D160242
- D160210
- D160201
- D160235
- D160234

Le Tableau 4 synthétise les excipients venant en complément de la formule initiale et stabilisant la conformation de la protéine afin de limiter le phénomène d'agrégation. Il s'agit entre autres des osmolytes et des ligands spécifiques. Agrégats disparus, tous les lots répondent au cahier des charges en matière de taille des microsphères, avec un diamètre médian inférieur à 100 µm.

Le seuil de significativité, ici plus faible, confirme globalement les tendances de la réponse 1. En effet, l'utilisation du Resomer® RG 503 plutôt que du Resomer® RG 503 H réduit légèrement le diamètre médian des particules. L'absence de stabilisant dans la PO réduit significativement la taille des microsphères à hauteur de 8 µm. Egalement, une concentration en PVA ou PVP de 2 % dans la PEA permet l'obtention de microsphères dont la taille est réduite de 15 µm comparé à une concentration de 4 %. Les formules constituées dans la PEA du PVA seul ou associé au NaCl ainsi que du PVP associé au Montanox® 80 sont celles qui permettent de former des microsphères de plus petites tailles. Comparées à ces 3 formules, la présence de l'association du PVA et du Montanox® 80 dans la PEA permet de former des microsphères ayant un diamètre médian plus important d'environ 13 µm. De même, la présence du PVP seul dans la PEA permet de former des microsphères ayant un diamètre médian plus important d'environ 30 µm.

Réponse 3 : L'étalement de la répartition granulométrique avant ultrasons : D (v;0.9) - D (v;0.1)

Sur les 18 expériences réalisées, l'étalement de la répartition granulométrique avant ultrasons oscille entre 32 µm et 740 µm. Les lots suivants ont un étalement supérieur à 90 µm :

- D160201
- D160207
- D160208
- D160210
- D160232
- D160235
- D160236
- D160238
- D160241
- D160242
- D160240
- D160234

Quel que soit le PLGA utilisé, la répartition granulométrique des microsphères produites est semblable. En revanche, l'absence de stabilisant dans la PO réduit significativement la distribution de 138 µm. Il n'y a pas de changement significatif de la répartition granulométrique des microsphères lorsque la concentration en PVA ou PVP dans la PEA est modifiée passant de 2% à 4% ou l'inverse. Ces données correspondent à celles retrouvées pour le diamètre médian des microsphères.

Le PVA utilisé seul ou en association dans la PEA favorise l'obtention des microsphères de taille plus homogène. L'étalement est en effet plus faible passant de 378µm à 219µm en présence de PVA et PVP respectivement.

Réponse 4 : L'étalement de la répartition granulométrique pendant les ultrasons : D (v;0.9) - D (v;0.1)

Sur les 18 expériences réalisées, l'étalement de la répartition granulométrique pendant les ultrasons oscille entre 27 μm et 199 μm . Sur les lots cités précédemment présentant un étalement supérieur à 90 μm , seuls les lots D160207 et D160232 n'ont pas eu une réduction significative de l'étalement sous l'effet des ultrasons. La présence d'agréats a été réduite grâce aux ultrasons, excepté pour ces deux lots qui présentent soit des agrégats persistants, soit deux populations granulométriques avérées, créés au cours de l'étape de fabrication.

L'utilisation du Resomer® RG 503 plutôt que du Resomer® RG 503 H permet d'obtenir de manière significative des microparticules ayant une distribution granulométrique plus étroite, avec une réduction de l'étalement de 20 μm .

L'absence de stabilisant dans la PO réduit l'étalement à hauteur d'environ 60 μm . Une concentration en PVA ou PVP de 2% dans la PEA favorise l'obtention de microsphères plus homogènes en taille, réduisant la largeur de la distribution granulométrique de 44 μm . L'utilisation de PVA seul dans la PEA permet de former des microsphères de taille homogène. Contrairement à avant les ultrasons, une association de stabilisant avec le PVA élargit la distribution de la taille de l'ordre de 60 μm comparé au PVA seul, lorsque l'analyse est réalisée pendant les ultrasons. L'utilisation de PVP en association avec le Montanox® 80 mène à une meilleure homogénéité de taille contrairement à l'utilisation de PVP seul, avec un étalement réduit de 76 μm .

Réponse 5 : La morphologie des microparticules

Seule la présence de Montane® 80 dans la phase organique engendre de manière significative des microsphères plus nettes, lisses et sans pores. La Figure 25 présente deux photos prises durant l'analyse en MEB qui illustrent ce propos. La formule du lot D160208 contient du Montane® 80, contrairement à la formule du lot D160209. Pour ce dernier, les microsphères obtenues ont des pores très visibles à leur surface. Certaines photos montrent également des phénomènes de coalescence entre les microparticules. Pour rappel, l'intégralité des photos des microsphères est disponible en annexe 4.

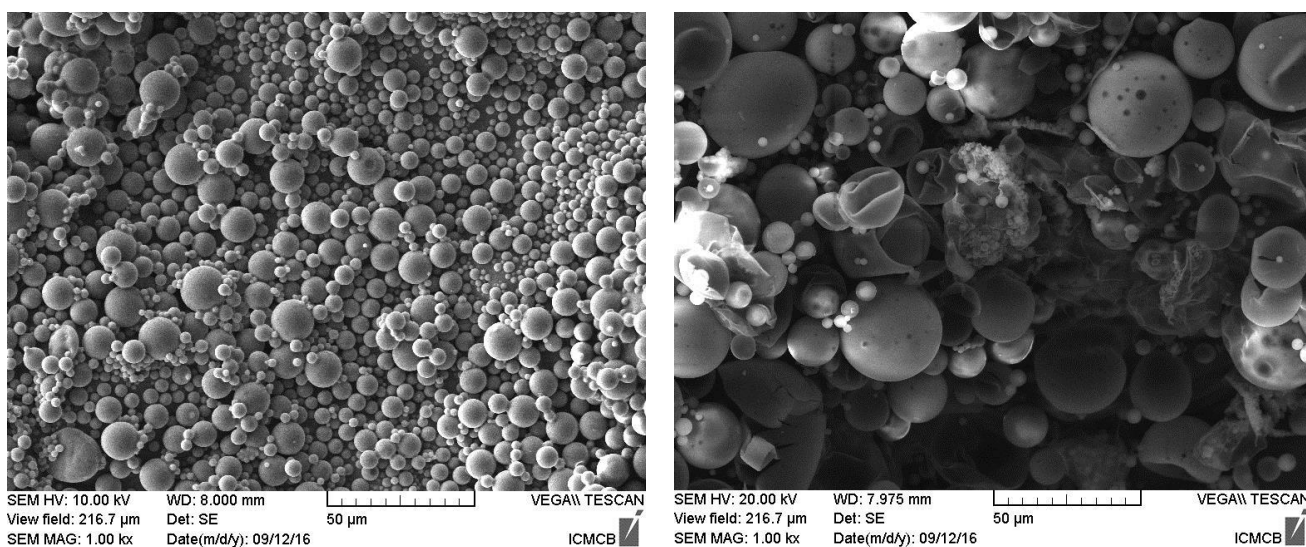


Figure 25 : Exemples d'images de microsphères en MEB, à gauche : lot D160208 ; à droite : lot D160209

IV.4. Discussion et conclusion sur le plan d'expériences réalisé

La réalisation d'essais préliminaires a permis dans un premier temps de maîtriser les différentes étapes du procédé de microencapsulation par la technique de l'évaporation de solvant basée sur la formation d'une double émulsion et dans un second temps de fixer un certain nombre de paramètres procédé à savoir les volumes des différentes phases, le type de l'appareil d'agitation ainsi que la vitesse et le temps d'agitation pour chaque étape. Les paramètres de lyophilisation suite aux essais préliminaires ont également pu être établis et sont décrits dans le Tableau 15. Par ailleurs, une interaction entre le PVP et le NaCl a pu être mise en évidence avec la réalisation de l'essai numéro trois. Cette première étape du travail expérimental a permis d'élaborer un plan d'expériences de type plan factoriel fractionnaire (plan de criblage), visant à étudier l'impact de plusieurs variables de formulation sur les caractéristiques granulométriques et sur la morphologie des microparticules.

Suite au plan d'expériences, les excipients qui retiennent notre attention sont regroupés dans le Tableau 24, le Tableau 25 et le Tableau 26. Il est à noter que les excipients qui permettent d'obtenir des microsphères de petites tailles sont également ceux qui permettent d'obtenir des microsphères poreuses. Afin de remplir le cahier des charges, et donc d'obtenir des microsphères ayant toutes les caractéristiques désirées, il est essentiel de trouver un compromis en termes de conditions opératoires.

Type de polymère	Stabilisant phase organique	Concentration PVA ou PVP dans phase externe aqueuse	Type de stabilisant phase externe aqueuse
Resomer® RG 503	Aucun	2%	PVA

Tableau 24 : Excipients retenus pour avoir une plus petite taille de microsphères

Type de polymère	Stabilisant phase organique	Concentration PVA ou PVP dans phase externe aqueuse	Type de stabilisant phase externe aqueuse
Resomer® RG 503	Aucun	2%	PVA

Tableau 25 : Excipients retenus pour avoir une meilleure homogénéité de taille de microsphères

Type de polymère	Stabilisant phase organique	Concentration PVA ou PVP dans phase externe aqueuse	Type de stabilisant phase externe aqueuse
Resomer® RG 503 ou RG 503H	Montane® 80	4%	PVA / NaCl 5% ou PVP / Montanox 80

Tableau 26 : Excipients retenus pour avoir des microsphères ayant une surface lisse et sans pores

Ainsi, avec une formulation simple c'est-à-dire sans ajout de stabilisant dans la PO, contenant une faible concentration de PVA et sans ajout d'un second agent stabilisant dans la PEA, il est possible d'obtenir des microsphères blanches de faibles diamètres. Ceci est en adéquation avec les données de la littérature [79]. En effet, en augmentant la viscosité des différentes phases, soit par augmentation de la concentration en PVA ou PVP, soit par ajout de plusieurs agents stabilisants secondaires, une plus grande force de cisaillement est nécessaire pour la formation des microgouttes. A vitesses d'agitations égales, les tailles de microsphères formées sont plus importantes lorsque la viscosité d'une ou des phases est augmentée [14]. Ici, la concentration en PLGA n'a pas été variée. Elle reste à surveiller lors de futurs essais car plus cette concentration est forte, plus la viscosité de la phase est importante. En revanche, les résultats obtenus ne sont pas en adéquation avec un autre point évoqué dans la littérature. En effet, le PVA est l'excipient le plus couramment utilisé dans la PEA afin de stabiliser la double émulsion. L'augmentation de sa concentration dans la formulation, passant de 1 à 10%, entraînerait plutôt une diminution de la taille des microsphères formées [79], à vitesses d'agitation égales. De plus, en théorie, l'utilisation d'un ester de sorbitane comme émulsifiant dans la PO à hauteur de 1 à 2% ainsi que l'utilisation d'un polysorbate dans la PEA en complément du PVA ou d'un autre agent stabilisant comme le PVP diminuerait également la taille des microsphères formées [68]. Ceci n'est pas le cas d'après les résultats du plan d'expériences. Il semblerait donc que la nécessité d'obtenir une viscosité la plus faible possible sur les différentes phases prime sur la quantité d'excipients stabilisants ajoutés. Des investigations complémentaires devra être menée afin d'expliquer cette contradiction. Il est également important de garder à l'esprit que plus les microsphères sont petites, plus leur surface extérieure apparente est importante. Les microsphères étant une matrice dans laquelle est dispersé le PA, celui-ci peut également être présent en surface de la microparticule, à l'instar des microcapsules. Des microsphères de trop petite taille peuvent donc être à l'origine d'un risque élevé de relargage massif des protéines au moment de l'administration (*burst effect*). Lors de futurs essais de microencapsulation de protéines, il sera essentiel d'évaluer la cinétique de libération de la protéine ou du peptide encapsulé. L'association du PVA et du Montanox® 80 plutôt que du PVA seul dans la PEA est néfaste car elle engendrerait des microsphères plus grosses et plus hétérogènes en taille. Or l'association du PVP avec le Montanox® 80 dans la PEA est quant à elle bénéfique, engendrant des tailles de particules plus petites ainsi qu'une meilleure homogénéité de taille comparée à l'utilisation du PVP seul. Il serait important ici d'analyser les interactions du PVA avec le Montanox® 80 et de comprendre les mécanismes mis en jeu sous ultrasons entre le Montanox 80 et le PVP ou le PVA.

Deuxièmement, concernant la morphologie des microsphères (variable qualitative), l'analyse passe par une analyse en MEB, assez subjective et doit être considérée par un traitement approprié. L'augmentation de la viscosité dans les différentes phases par augmentation de la concentration en PVA ou PVP, ou bien par ajout de plusieurs agents stabilisants secondaires, soit dans la PO avec le Montane® 80, soit dans la PEA avec le NaCl et le Montanox® 80 semble mener à l'obtention de microsphères ayant un aspect plus lisse de faible porosité. Toutefois, cet aspect lisse est associé à une augmentation de la gamme de taille des microsphères. Le mécanisme d'action du NaCl est bien connu. Le NaCl présent dans la phase externe aqueuse, de part une augmentation de la pression osmotique du milieu, densifie la structure interne des microparticules. Celle-ci aurait donc ainsi un aspect plus lisse donc une forme plus nette [72]. Obtenir des microsphères lisses, non poreuses est un critère extrêmement important pour permettre une cinétique de relargage de la protéine ou du peptide encapsulé après administration, exempte d'effet « burst ». Il serait important ici d'effectuer des essais

complémentaires de microencapsulation en utilisant dans la PEA d'autres types de stabilisants secondaires, comme le PEG 400 qui apparaît également dans la littérature [42]. La porosité des microsphères tend à diminuer avec l'augmentation de la température, ce jusqu'à une certaine limite afin d'éviter une évaporation trop rapide du solvant et la formation par conséquence de microsphères à forte porosité [60]. Un point d'amélioration pour de futurs essais de microencapsulation serait donc de jouer sur la température afin d'observer un potentiel effet positif sur l'absence de porosité des microsphères.

En conclusion, les essais préliminaires de microencapsulation ont permis de développer la technique de l'évaporation de solvant basée sur la double émulsion ainsi que de maîtriser les paramètres du cycle de lyophilisation de la suspension de microsphères récoltées. Un plan d'expériences clair et défini a pu ainsi être établi. Il a permis de mettre en valeur des excipients qui avaient un impact positif sur la taille et la forme des microsphères formées. Une optimisation du procédé de fabrication, notamment une augmentation des vitesses d'agitation lors des émulsions primaires et secondaires, pourrait permettre d'améliorer la taille des microparticules, tant sur leur dimension que sur leur uniformité. C'est pour cela qu'il est important de retenir les formules qui ont permis d'obtenir des microsphères aux surfaces lisses, non poreuses et d'optimiser le procédé de fabrication sur ces formules.

Doivent être exploités la piste d'une interaction entre le PVA et le Montanox® 80 et les phénomènes d'agrégation rencontrés lors de l'analyse par diffraction laser. Ces agrégats n'étaient pas automatiquement supprimés suite aux ultrasons ou bien réapparaissaient après. Cette reconstitution dans de l'eau doit reproduire les conditions opératoires lors de l'administration chez un patient. Il serait intéressant d'évaluer ces phénomènes d'agrégation lors de la reconstitution du lyophilisat avec du tampon PBS (*phosphate buffer* saline) par exemple ou en présence d'osmolytes pouvant être administrés par voie parentérale, tel que ceux décrits dans le Tableau 4. Il est ainsi important d'explorer l'utilisation d'autres agents stabilisants tels que le PVA avec des indices de poids moléculaires différents, la PVP K12 qui est un excipient approuvé pour l'administration par voie parentérale chez l'homme, ou encore le PEG 400 [42].

Enfin, pour chaque protéine thérapeutique à encapsuler, le comportement des microsphères formées sera différent et les procédés de fabrication et de lyophilisation seront à adapter. Les problématiques d'obtention d'un taux et d'un rendement d'encapsulation élevés associées à une cinétique de libération du PA répondant au cahier des charges seront alors considérées. Afin d'anticiper les futurs besoins de microencapsulation d'une protéine ou d'un peptide d'intérêt, ce dernier paragraphe est une revue de la littérature afin d'adapter au mieux le procédé de fabrication préalablement établi à la protéine ou au peptide à encapsuler. Afin d'optimiser le taux d'encapsulation de la protéine ou du peptide, il est possible de faire varier la température. En effet, à 4°C et 38°C, le taux d'encapsulation de la protéine dans le polymère atteint les 50%. Ce taux ne dépasse pas les 19% lorsque les températures des différentes phases sont à température ambiante soit entre 22°C et 29°C. Les températures faibles augmentent la non miscibilité entre le polymère et l'eau. Cela implique une formation rapide de la microsphère et un emprisonnement de la protéine dès le début de l'évaporation du solvant. Les températures élevées augmentent la vitesse d'évaporation du solvant et sa cinétique d'évaporation. La formation des microsphères est ainsi plus rapide et efficace par concentration du polymère dans la phase organique. Notons que les températures extrêmes sont en contrepartie plus favorables à la formation de microsphères de taille plus élevée. Afin de garantir la stabilité de la protéine, certains excipients peuvent être ajoutés dans la formule. Le polyéthylène glycol, certains

sucres comme le maltose et les cyclodextrines sont des excipients pouvant être utilisés dans la formule afin de prévenir l'agrégation et la dénaturation des protéines thérapeutiques. Ils peuvent aussi stabiliser l'interface phase organique / phase aqueuse. Ces excipients occupent en effet cette interface à la place de la protéine ou bien la modifient afin de limiter l'adsorption des protéines. Par ailleurs, en augmentant la viscosité de la solution, le taux de diffusion des protéines ou des peptides ralentit à l'interface phase organique / phase aqueuse. Pour terminer, un autre moyen de stabiliser l'actif à encapsuler est d'augmenter sa concentration. Cela prévient en partie son adsorption et sa dénaturation à l'interface phase organique / phase aqueuse.

V. Conclusion générale

Au travers de cette thèse, une revue bibliographique a été effectuée afin de comprendre les problématiques de stabilité des protéines thérapeutiques. Ces molécules synthétisées ou obtenues par biotechnologie ont une structure tridimensionnelle à conserver si l'on veut maintenir leur activité biologique. Le développement industriel de leur formulation et du procédé de fabrication représente donc un défi. La voie injectable reste la voie d'administration privilégiée tant la voie entérale est source de dégradation ou d'instabilités physico-chimiques pour ces molécules actives. La liste des excipients utilisés dans les formules est réduite du fait de leur administration par voie parentérale. Outre cette exigence d'innocuité, ces excipients doivent garantir in vivo la stabilité, l'efficacité et la sécurité de la protéine ou du peptide. Une autre préoccupation thérapeutique concerne la demi-courbe des protéines et peptides thérapeutiques, impliquant des injections répétées du médicament chez le patient. Une des stratégies d'administration mise en œuvre repose sur le développement de systèmes injectables à libération prolongée, permettant de mettre à disposition le PA dans l'organisme sur des périodes plus ou moins longues. Notamment, les suspensions microparticulaires à base de polymères biocompatibles et biodégradables-biorésorbables tels que les copolymères dérivés des acides lactiques et glycoliques appelés PLGA, administrés par voie IM ou SC, permettent de réduire le nombre d'injections et favorisent une meilleure adhésion du patient au traitement. Dans ce contexte, un travail expérimental a été initié au sein de l'entreprise Bertin Pharma pour développer dans un premier temps des suspensions de microparticules blanches (sans principe actif) dont les caractéristiques seraient compatibles avec une administration IM. La technique de l'évaporation de solvant basée sur la formation d'une double émulsion a été retenue comme mode de fabrication. L'étude a été menée au travers d'un plan d'expériences. Ce dernier a permis de sélectionner plusieurs excipients favorisant la création de microsphères de tailles inférieures à 100µm, monodisperses, lisses et non poreuses. Ce travail expérimental servira de base à un futur développement de suspensions de microsphères biodégradables dont les conditions opératoires devront être ajustées et optimisées en présence de la future molécule active d'intérêt à encapsuler.

THÈSE SOUTENUE PAR M^{LE} VIRGINIE FAYOLLE

PROBLÉMATIQUES DE FORMULATIONS DE PROTÉINES THÉRAPEUTIQUES DESTINÉES À LA VOIE INJECTABLE

CONCLUSION :

Au travers de cette thèse, une revue bibliographique a été effectuée afin de comprendre les problématiques de stabilité des protéines thérapeutiques. Ces molécules synthétisées ou obtenues par biotechnologie ont une structure tridimensionnelle à conserver si l'on veut maintenir leur activité biologique. Le développement industriel de leur formulation et du procédé de fabrication représente donc un défi. La voie injectable reste la voie d'administration privilégiée tant la voie entérale est source de dégradation ou d'instabilités physico-chimiques pour ces molécules actives. La liste des excipients utilisés dans les formules est réduite du fait de leur administration par voie parentérale. Outre cette exigence d'innocuité, ces excipients doivent garantir *in vivo* la stabilité, l'efficacité et la sécurité de la protéine ou du peptide. Une autre préoccupation thérapeutique concerne la demi-courte des protéines et peptides thérapeutiques, impliquant des injections répétées du médicament chez le patient. Une des stratégies d'administration mise en œuvre repose sur le développement de systèmes injectables à libération prolongée, permettant de mettre à disposition le PA dans l'organisme sur des périodes plus ou moins longues. Notamment, les suspensions microparticulaires à base de polymères biocompatibles et biodégradables-biorésorbables tels que les copolymères dérivés des acides lactiques et glycoliques appelés PLGA, administrés par voie IM ou SC, permettent de réduire le nombre d'injections et favorisent une meilleure adhésion du patient au traitement. Dans ce contexte, un travail expérimental a été initié au sein de l'entreprise Bertin Pharma pour développer dans un premier temps des suspensions de microparticules blanches (sans principe actif) dont les caractéristiques seraient compatibles avec une administration IM. La technique de l'évaporation de solvant basée sur la formation d'une double émulsion a été retenue comme mode de fabrication. L'étude a été menée au travers d'un plan d'expériences. Ce dernier a permis de sélectionner plusieurs excipients favorisant la création de microsphères de tailles inférieures à 100µm, monodisperses, lisses et non poreuses. Ce travail expérimental servira de base à un futur développement de suspensions de microsphères biodégradables dont les conditions opératoires devront être ajustées et optimisées en présence de la future molécule active d'intérêt à encapsuler.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 05/09/17

LE DOYEN
DE L'UFR DE PHARMACIE

Pour la Présidente
et par délégation
Pr. Michel SÈVE
Le Doyen de Pharmacie
Pr. Michel SEVE

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE
JURY DE PHARMACIE

Pr. Denis WOUESSIDJEWE

UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
D.P.M. - UFR Pharmacie
Pr WOUESSIDJEWE Denis
Bâtiment E André Rassat
470 rue de la chimie
38400 SAINT MARTIN HERES

REFERENCES

- [1] M. Decaffmeyer, A. Thomas, et R. Brasseur, « Les médicaments peptidiques : mythe ou réalité ? », *BASE*, mars 2008.
- [2] « DIRECTIVE 2004/27/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 31 mars 2004 modifiant la directive 2001/83/CE instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain ».
- [3] *Code de la santé publique - Article L5111-1*, vol. L5111-1.
- [4] « Définition statistique de la biotechnologie (mise à jour en 2005) - OCDE ». [En ligne]. Disponible sur:
<http://www.oecd.org/fr/sti/biotech/definitionstatistiquedelabiotechnologiemiseajouren2005.htm>. [Consulté le: 08-mars-2017].
- [5] S. Bourgoïn-Voillard, W. Rachidi, et M. Seve, *Les biotechnologies en santé, tome I : Introduction aux biotechnologies en santé*, Lavoisier.
- [6] *Code de la santé publique - Article L5121-1*, vol. L5121-1. .
- [7] « L'ANSM publie une mise au point sur les médicaments biosimilaires - Point d'Information - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé », 13-juill-2016. [En ligne]. Disponible sur: <http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/L-ANSM-publie-une-mise-au-point-sur-les-medicaments-biosimilaires-Point-d-Information>. [Consulté le: 13-juill-2016].
- [8] « Biomédicaments-etat-des-lieux-2014.pdf » [En ligne]. Disponible sur: www.leem.org [Consulté le: 08-mars-2017]
- [9] « Pré-Requis 2 (Vaccinations) », 14-avr-2016. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.uvp5.univ-paris5.fr/campus-pediatric/cycle2/poly/1702acq.asp>. [Consulté le: 14-avr-2016].
- [10] « Mécanisme d'action des vaccins, rôle des adjuvants, Stéphane Paul » [En ligne]. Disponible sur: <http://www.assim.refer.org/colleges/colleges/styled/files/page80-l3.10.vaccins.pdf> [Consulté le: 04-fev-2017]
- [11] « Formulation and development of vaccines and their selection for next generation, Bulletin of Pharmaceutical Research 2011 ».
- [12] « Étude comparative de la réponse des lymphocytes B humains naïfs et mémoires in vitro ». .
- [13] « La biologie, science du vivant: Protéines ». [En ligne]. Disponible sur: <http://coursde-medecine.blogspot.com/2013/01/proteines.html>. [Consulté le: 14-avr-2017].
- [14] A. K. Banga, *Therapeutic peptides and proteins : formulation, processing, and delivery systems*. Technomic, 1995.
- [15] « Structure primaire acide amine amino acid Enseignement et recherche Biochimie Emmanuel Jaspard Université Angers biochimej ». [En ligne]. Disponible sur: <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/3Structure/1StructPrimQuat/3AcidesAmines/1AcidAmine.htm>. [Consulté le: 18-avr-2016].
- [16] « Les acides aminés : Structures - seve_michel_UJF.pdf ».
- [17] « La structure des protéines - Eric Lacouture »[en ligne] Disponible sur <http://eric.lacouture.free.fr/lycee/1ereS/1ereS-ch9.pdf> [Consulté le 24-août-2017]
- [18] « Résumé des Caractéristiques du Produit - CALCITONINE PHARMY II 100 U.I./1 ml, solution injectable ». [En ligne]. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0220712.htm>. [Consulté le: 26-août-2017].
- [19] « Production de protéines recombinantes - M2 Recherche Biomed Montpellier ». .
- [20] Valderrama-Rincon et al, « An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in Escherichia coli ». [En ligne]. Disponible sur:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3449280/>. [Consulté le: 15-juin-2017].
- [21] « Culture cellulaire : Trois étapes clés pour produire des protéines thérapeutiques - Industrie Pharmaceutique », 12-juill-2016. [En ligne]. Disponible sur:
<http://www.industrie.com/pharma/culture-cellulaire-trois-etapes-cles-pour-produire-des-proteines-therapeutiques,39248>. [Consulté le: 12-juill-2016].

- [22] « Biochimie des protéines BCM514 », 18-avr-2016. [En ligne]. Disponible sur: <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/2a.html>. [Consulté le: 18-avr-2016].
- [23] S. B. H. Kent, « Chemical Synthesis of Peptides and Proteins », <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.004521>, 28-nov-2003. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bi.57.070188.004521>. [Consulté le: 30-mai-2017].
- [24] « Les acides aminés et la synthèse peptidique | CultureSciences-Chimie ». [En ligne]. Disponible sur: <http://culturesciences.chimie.ens.fr/content/les-acides-amin%C3%A9s-et-la-synth%C3%A8se-peptidique#vitro>. [Consulté le: 30-mai-2017].
- [25] « VIDAL : Base de données médicamenteuse pour les prescripteurs libéraux », VIDAL. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/>. [Consulté le: 30-mai-2017].
- [26] « Avis au demandeur d'AMM ». [en ligne] Disponible sur : http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/ae1f0487eee12fc471179ecda8ccb21d.pdf [Consulté le 20-mai-2016]
- [27] *Décret no 94-352 du 4 mai 1994 relatif à la protection des travailleurs contre les risques résultant de leur exposition à des agents biologiques et modifiant le code du travail (deuxième partie: Décrets en Conseil d'Etat)*. 1994.
- [28] « International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH). Guideline for industry : impurities in new drug substance, ICH Q3A, Q3B and Q6A. » .
- [29] « Les médicaments de thérapie innovante (MTI, ATMP) - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé ». [En ligne]. Disponible sur: [http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Medicaments-de-therapie-innovante-et-preparations-cellulaires-a-finalite-therapeutique/Les-medicaments-de-therapie-innovante-MTI-ATMP/\(offset\)/4](http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Medicaments-de-therapie-innovante-et-preparations-cellulaires-a-finalite-therapeutique/Les-medicaments-de-therapie-innovante-MTI-ATMP/(offset)/4). [Consulté le: 26-août-2017].
- [30] « Avis au demandeur d'AMM ». .
- [31] « Etat des lieux sur les médicaments biosimilaires - Mail 2016 - ANSM ». .
- [32] « Le système ATC/DDD- Abdel majid BELAICHE - WHO ». .
- [33] « Biomédicaments-etat-des-lieux-2014.pdf ». .
- [34] « Conservation et transport des biomédicaments | Sofrigam ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.sofrigam.fr/chaine-du-froid-biomedicaments-pourquoi-est-elle-si-importante>. [Consulté le: 27-août-2017].
- [35] L. Nault, C. Vendrely, Y. Bréchet, F. Bruckert, et M. Weidenhaupt, « Peptides that form β -sheets on hydrophobic surfaces accelerate surface-induced insulin amyloid aggregation », *FEBS Lett.*, vol. 587, n° 9, p. 1281-1286, mai 2013.
- [36] « Biologie cellulaire 10 ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.vdsociences.com/pages/sciences-biologiques/biologie-cellulaire/biologie-cellulaire-10.html>. [Consulté le: 18-avr-2017].
- [37] « Oxydation et radicaux libres ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.guide-vitamines.org/dossiers-guide-vitamines/antioxydants/oxydation-radicaux-libres.html>. [Consulté le: 04-févr-2017].
- [38] « Pharmacopée Française - Solutions tampons - d4f7a6444c5623cd6d6e0cbdc32313ac.pdf ». [En ligne]. Disponible sur: http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/d4f7a6444c5623cd6d6e0cbdc32313ac.pdf. [Consulté le: 31-mai-2017].
- [39] « European Pharmacopoeia Online 9.0 ». [En ligne]. Disponible sur: <http://online6.edqm.eu/ep900/>. [Consulté le: 31-mai-2017].
- [40] T. J. Kamerzell, R. Esfandiary, S. B. Joshi, C. R. Middaugh, et D. B. Volkin, « Protein-excipient interactions: mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, n° 13, p. 1118-1159, oct. 2011.
- [41] T. O. Street, D. W. Bolen, et G. D. Rose, « A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, n° 38, p. 13997-14002, sept. 2006.

- [42] « A3P - La lyophilisation et les enjeux pour les métiers de la santé (La Vague 36) ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.a3p.org/index.php/articles-techniques-et-scientifiques/1175-la-lyophilisation-et-les-enjeux-pour-les-m%C3%A9tiers-de-la-sant%C3%A9-la-vague-36.html>. [Consulté le: 28-avr-2017].
- [43] A. Bhambhani, J. M. Kissmann, S. B. Joshi, D. B. Volkin, R. S. Kashi, et C. R. Middaugh, « Formulation design and high-throughput excipient selection based on structural integrity and conformational stability of dilute and highly concentrated IgG1 monoclonal antibody solutions », *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, n° 3, p. 1120-1135, mars 2012.
- [44] V. I. Razinkov et G. Kleemann, *High-Throughput Formulation Development of Biopharmaceuticals: Practical Guide to Methods and Applications*. Woodhead Publishing, 2016.
- [45] « ICH E10 - Q9_Guideline.pdf ». .
- [46] « CFR - Code of Federal Regulations Title 21 - General and Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceuticals, Subpart D-211.65 ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=211.65>. [Consulté le: 02-mai-2017].
- [47] « Directive 2001/83/EC section 3.2.2.2 (g) ». [En ligne]. Disponible sur: http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2001_83_consol_2012/dir_2001_83_cons_2012_en.pdf. [Consulté le: 02-mai-2017].
- [48] « (1664) Assessment of drug product leachables associated with pharmaceutical packaging/delivery systems ». [En ligne]. Disponible sur: http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/meetings/workshops/m7127.pdf. [Consulté le: 02-mai-2017].
- [49] « The Product Quality Research Institute (PQRI) Leachables and Extractables Working Group Initiatives for Parenteral and Ophthalmic Drug Product (PODP). - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24084659>. [Consulté le: 02-mai-2017].
- [50] « CDER Guidance Document : container closure systems for packaging human drugs and biologics. », 1999. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070551.pdf>. [Consulté le: 02-mai-2017].
- [51] « Metal Leachables in Therapeutic Biologic Products: Origin, Impact and Detection | American Pharmaceutical Review - The Review of American Pharmaceutical Business & Technology ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/116570-Metal-Leachables-in-Therapeutic-Biologic-Products-Origin-Impact-and-Detection/>. [Consulté le: 02-mai-2017].
- [52] « FDA-Regulated products that contain bisphenol-A; request for informations. Federal Register, 2008. 73(200): p.61136-61136 ».
- [53] « Extractables/leachables from plastic tubing used in product manufacturing ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517306001335>. [Consulté le: 02-mai-2017].
- [54] S. Cohen, T. Yoshioka, M. Lucarelli, L. H. Hwang, et R. Langer, « Controlled Delivery Systems for Proteins Based on Poly(Lactic/Glycolic Acid) Microspheres », *Pharm. Res.*, vol. 8, n° 6, p. 713-720, juin 1991.
- [55] R. Vaishya, V. Khurana, S. Patel, et A. K. Mitra, « Long-Term Delivery of Protein Therapeutics », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 12, n° 3, p. 415-440, mars 2015.
- [56] A. Patel, K. Cholkar, et A. K. Mitra, « Recent developments in protein and peptide parenteral delivery approaches », *Ther. Deliv.*, vol. 5, n° 3, p. 337-365, mars 2014.
- [57] A. Lorin et C. Flore, « Les liposomes : description, fabrication et applications », 2004. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.pressesagro.be/base/text/v8n3/163.pdf>. [Consulté le: 08-mai-2017].
- [58] F. Y. Han, K. J. Thurecht, A. K. Whittaker, et M. T. Smith, « Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading », *Front. Pharmacol.*, vol. 7, p. 185, 2016.

- [59] « Biodégradable - Définition ». [En ligne]. Disponible sur: https://www.actu-environnement.com/ae/dictionnaire_environnement/definition/biodegradable.php4. [Consulté le: 28-août-2017].
- [60] « Glossaire - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé ». [En ligne]. Disponible sur: [http://ansm.sante.fr/Glossaire/\(filter\)/B#term_25531](http://ansm.sante.fr/Glossaire/(filter)/B#term_25531). [Consulté le: 28-août-2017].
- [61] J. Richard et J.-P. Benoît, « Microencapsulation ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/cosmetiques-42634210/microencapsulation-j2210/>. [Consulté le: 04-juill-2017].
- [62] P. Gentile, V. Chiono, I. Carmagnola, et P. V. Hatton, « An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, n° 3, p. 3640-3659, févr. 2014.
- [63] « Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery - 1-s2.0-S1319016412000424-main.pdf ».
- [64] L. Jorgensen, E. H. Moeller, M. van de Weert, H. M. Nielsen, et S. Frokjaer, « Preparing and evaluating delivery systems for proteins », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 29, n° 3-4, p. 174-182, nov. 2006.
- [65] « Pharmaceuticals - BASF ». [En ligne]. Disponible sur: <https://industries.basf.com/en/Pharmaceuticals.html>. [Consulté le: 15-sept-2016].
- [66] « Merck Millipore | Sciences de la vie | Produits chimiques industriels & de laboratoire | Achats en ligne ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.merckmillipore.com/FR/fr>. [Consulté le: 12-mai-2017].
- [67] D. L. Wise, *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. CRC Press, 2000.
- [68] « Polymer microspheres for controlled drug release », 26-mai-2016. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517304002492>. [Consulté le: 26-mai-2016].
- [69] « The mechanism of PLA microparticle formation by water-in-oil-in-water solvent evaporation method. - PubMed - NCBI », 16-juin-2016. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12022499>. [Consulté le: 16-juin-2016].
- [70] « Method for drying microspheres », 30-juin-2016.
- [71] « Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X06001840>. [Consulté le: 13-mars-2017].
- [72] C. Martín-Sabroso, A. I. Fraguas-Sánchez, J. Aparicio-Blanco, M. F. Cano-Abad, et A. I. Torres-Suárez, « Critical attributes of formulation and of elaboration process of PLGA-protein microparticles », *Int. J. Pharm.*, vol. 480, n° 1-2, p. 27-36, mars 2015.
- [73] S. Mao, J. Xu, C. Cai, O. Germershaus, A. Schaper, et T. Kissel, « Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres », *Int. J. Pharm.*, vol. 334, n° 1-2, p. 137-148, avril 2007.
- [74] R. L. McCall et R. W. Sirianni, « PLGA Nanoparticles Formed by Single- or Double-emulsion with Vitamin E-TPGS », *J. Vis. Exp. JoVE*, n° 82, déc. 2013.
- [75] « W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent : effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles ».
- [76] P. Zhai, X. B. Chen, et D. J. Schreyer, « PLGA/alginate composite microspheres for hydrophilic protein delivery », *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, vol. 56, p. 251-259, nov. 2015.
- [77] A. Aubert-Pouëssel *et al.*, « In vitro study of GDNF release from biodegradable PLGA microspheres », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 95, n° 3, p. 463-475, mars 2004.
- [78] L. Hovgaard et S. Frokjaer, *Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins*. Taylor & Francis, 2000.

- [79] S. Freitas, H. P. Merkle, et B. Gander, « Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 102, n° 2, p. 313-332, févr. 2005.
- [80] « Formulation development, systematic optimization of PLGA-CS-Tween 80 nanoparticles of Rivastigmine Tartrate for treatment of Alzheimer's disease ».
- [81] « Isoelectric Focusing | National Diagnostics ».
- [82] « Centre de biophysique moléculaire - UPR 4301 - Le dichroïsme circulaire ».

ANNEXE 1 : Les biomédicaments disponibles sur le marché français

Nom	Composition	Laboratoire	Date obtention AMM	Classe pharmaceutique
Act-Hib	vaccin haemophilus influenzae type A (conjugué)	Sanofi Pasteur MSD	06/02/1992	Vaccin
Actilyse	altéplase	Boehringer	11/04/1991	Enzyme thrombolytique
Actrapid	insuline humaine	Novo Nordisk	07/10/2002	Insuline
Adcetris	brentuximab védotin	Takeda	25/10/2012	Anticorps monoclonal
Advate	octocog alpha	Baxter	02/03/2004	Facteur de coagulation
Agrippal	vaccin grippal inactivé	Novartis	22/03/1999	Vaccin
Aldurazyme	laronidase	Genzyme	10/06/2003	Enzyme métabolique
Apidra	insuline glulisine	Sanofi	27/09/2004	Insuline
Aranesp	darbépoétine alpha	Amgen	08/06/2001	Facteur de croissance : Erythropoïétine
Arzerra	ofatumumab	GlaxoSmithKline	19/04/2010	Anticorps monoclonal
Avastin	bévacizumab	Roche	12/01/2005	Anticorps monoclonal
Avaxim	vaccin de l'hépatite A	Sanofi Pasteur MSD	07/08/1996	Vaccin
Avonex	interféron bêta-1a	Biogen	13/03/1997	Cytokine : Interféron
Benefix	nonacog alpha	Wyeth	30/07/2007	Facteur de coagulation
Benlysta	bélimumab	GlaxoSmithKline	13/07/2011	Anticorps monoclonal
Beromun	tasonermine	Boehringer	13/04/1999	Cytokine : TNFa
Betaferon	interféron bêta-1b	Schering AG	30/11/1995	Cytokine : Interféron
Bexsero	vaccin méningococcique du groupe B	Novartis vaccines and diagnostics	14/01/2013	Vaccin
Binocrit	époétine alfa	Sandoz	28/08/2007	Facteur de croissance hématopoïétique: Erythropoïétine
Boostrixtetra	vaccin diphtérique, tétanique, coquelucheux et poliomyélitique	GlaxoSmithKline	07/01/2005	Vaccin
Celvapan	vaccin grippal inactivé, fragmenté souche A	Baxter	04/03/2009	Vaccin
Cerezyme	imiglucérase	Genzyme	17/11/1997	Enzyme métabolique
Cervarix	papillomavirus humain type 16,18	GlaxoSmithKline	20/09/2007	Vaccin
Cimzia	certolizumab pégol	UCB Pharma France	01/10/2009	Anticorps monoclonal
Dukoral	vaccin oral contre le choléra	Novartis vaccines and diagnostics	28/04/2004	Vaccin
Elaprase	idursulfase	Shire	08/01/2007	Enzyme
Elonva	corifollitropin alpha	Merck Sharp & Dohme	25/01/2010	Hormone sexuelle stimulante: Gonadotrophine
Enbrel	étanercept	Wyeth	03/02/2000	Autres : Protéine de fusion
Encepur	vaccin contre le méningoencéphalite à tiques	Novartis	04/08/2005	Vaccin
Engerix	antigène protéique HBs recombinant	GlaxoSmithKline	12/10/1994	Vaccin
Eporatio	époétine theta	Ratiopharm	29/10/2009	Facteur de croissance hématopoïétique: Erythropoïétine
Eprex	époétine alpha	Janssen	09/02/1994	Facteur de croissance hématopoïétique Erythropoïétine
Erbix	cétuximab	Merck Serono	20/02/2007	Anticorps monoclonal
Eylea	aflibercept	Bayer	22/11/2012	Autres : Protéine de fusion
Fabrazyme	algalsidase bêta	Janssen	03/08/2001	Enzyme métabolique
Fasturtec	rasburicase	Sanofi	23/02/2001	Enzyme métabolique
Fluarix	vaccin grippal inactivé à virion fragmenté	GlaxoSmithKline	15/06/1998	Vaccin
Fluenz	vaccin influenza	Astrazeneca	27/01/2011	Vaccin

Nom	Composition	Laboratoire	Date obtention AMM	Classe pharmaceutique
Focetria	vaccin grippal pandémique	Novartis	02/05/2007	Vaccin
Forsteo	tériparatide	Eli Lilly	10/06/2003	Hormone: Autres (analogue de la PTH)
Fuzeon	enfuvirtide	Roche	27/05/2003	Autre : inhibiteur d'entrée VIH
Gardasil	papillomavirus (6, 11, 16, 18)	Merck Serono	20/09/2006	Vaccin
Genhevac	antigène de surface de l'hépatite b recombinant	Sanofi Pasteur	21/12/1987	Vaccin
Genotonorm	somatotropine	Pfizer	11/03/1991	Hormone de croissance: Somatotropine
Glucagen	glucagon humain biogénétique	Novo Nordisk	04/10/1993	Autre
Gonal-f	folitropine alpha	Merck Serono	20/10/1995	Hormone sexuelle stimulante: Gonadotrophine
Granocyte	lénograstim	Chugai	06/12/1996	Facteurs de croissance hématopoïétique : G-CSF
Havrix	vaccin inactivé de l'hépatite A	GlaxoSmithKline	18/08/1994	Vaccin
HBVAXPRO	vaccin antigène HBs	Sanofi	27/04/2001	Vaccin
Helixate nexgen	octocog alpha	Bayer AG	04/08/2000	Facteur de coagulation
Herceptin	trastumuzab	Roche	28/08/2000	Anticorps monoclonal
Humalog	insuline lispro	Eli Lilly	30/04/1996	Insuline
Humira	adalimumab	Abbott	08/09/2003	Anticorps monoclonal
Ilaris	canakinumab	Novartis	23/10/2009	Anticorps monoclonal
Immugrip	vaccin grippal inactivé à virion fragmenté	Pierre Fabre	14/05/1991	Vaccin
Imovax Polio	vaccin poliomyélitique (inactivé)	Sanofi Pasteur MSD	02/07/1982	Vaccin
Imukin	interféron gamma-1b	Boehringer	30/09/1992	Cytokine : Interféron
Increlex	mécasermine	Ipsen	03/08/2007	Hormone: Autres (facteur de croissance)
Inductos	dibotermine alpha	Wyeth	09/09/2002	Autre : Protéine ostéoformatrice
Infanrix hexa	vaccin hépatite B-ipv hib	GlaxoSmithKline	23/10/2000	Vaccin
Infanrix Quinta	polyoside d'haemophilus influenzae B couplé à l'anatoxine tétanique	GlaxoSmithKline	27/06/1997	Vaccin
Infanrix Tetra	vaccin poliomyélitique inactivé de type 3	GlaxoSmithKline	07/08/1997	Vaccin
Influvac	vaccin grippal inactivé à antigènes de surface	Abbott	15/06/1998	Vaccin
Insulatard	insuline humaine	Novo Nordisk	07/10/2002	Insuline
Insuman	insuline humaine	Sanofi	11/11/1998	Insuline
Intanza	vaccin influenza	Sanofi Pasteur	24/02/2009	Vaccin
Introna	interféron alpha-2b	Schering Plough	09/03/2000	Cytokine : Interféron
Ixiaro	vaccin contre le virus de l'encéphalite japonaise	Novartis	31/03/2009	Vaccin
Japanese encephalitis vaccine	vaccin contre le virus de l'encéphalite japonaise	Eusa Pharma	01/05/2009	Vaccin
Kepivance	palifermine	Amgen	25/10/2005	Facteur de croissance des kératinocytes
Kineret	anakinra	Amgen	08/03/2002	Autre: Antagoniste du récepteur d'interleukines
Kogenate	octocog alpha	Bayer AG	04/08/2000	Facteur de coagulation
Lantus	insuline glargine	Sanofi	09/06/2000	Insuline
Leukine	sargramostim	Berlex Laboratories	13/05/2008	Facteur de croissance hématopoïétique : G-CSF
Levemir	insulin detemir	Novo Nordisk	01/06/2004	Insuline
Lucentis	ranibizumab	Novartis	22/01/2007	Anticorps monoclonal

Nom	Composition	Laboratoire	Date obtention AMM	Classe pharmaceutique
Luveris	lutropine alpha	Merck Serono	29/11/2000	Hormone sexuelle stimulante: Gonadotrophine
Mabthera	rituximab	Roche	02/06/1998	Anticorps monoclonal
Mencevax	vaccin méningococcique A, C, W135, Y	GlaxoSmithKline	19/05/2008	Vaccin
Meningitec	vaccin méningococcique C	Pfizer	16/11/2007	Vaccin
Menjugatekit	vaccin méningococcique du groupe C conjugué	Novartis	06/07/2006	Vaccin
Menveo	vaccin méningococcique des groupes A, C, W-135 et Y conjugués	Novartis	15/03/2010	Vaccin
Metalyse	ténecteplase	Boehringer	23/02/2001	Enzyme thrombolytique
Mircera	époétine beta methoxy polyéthylène	Roche	20/07/2007	Facteur de croissance hématopoïétique: Erythropoïétine
Mixtard	insuline humaine	Novo Nordisk	07/10/2002	Insuline
M-M-RVAXPRO	vaccin rougeoleux, ourlien et rubéoleux	Sanofi Pasteur MSD	05/05/2006	Vaccin
Myozyme	alglucosidase alpha	Genzyme	29/03/2006	Enzyme métabolique
Naglazyme	N-acétylgalactosamine	Biomarin	24/01/2006	Enzyme métabolique
Neisvac	vaccin méningococcique du groupe C	Baxter	24/11/2003	Vaccin
Neorecormon	époétine beta	Roche	02/04/1998	Facteur de croissance hématopoïétique: Erythropoïétine
Neulasta	pegfilgrastim pegillé	Amgen	22/08/2002	Facteur de croissance hématopoïétique : G-CSF
Neupogen	filgrastim	Amgen	15/07/1991	Facteur de croissance hématopoïétique : G-CSF
Nimenrix	vaccin méningococcique A, C, W-135, Y	GlaxoSmithKline	20/04/2012	Vaccin
Nivestim	filgrastim	Hospira France	08/06/2010	Facteur de croissance hématopoïétique : G-CSF
Norditropine	somatropine	Novo Nordisk	19/01/2000	Hormone de croissance: Somatotropine
Novomix 30	insuline aspart	Novo Nordisk	01/08/2000	Insuline
Novorapid	insuline aspart	Novo Nordisk	07/09/1999	Insuline
Novoseven	eptocag alpha	Novo Nordisk	23/02/1996	Facteur de coagulation
Nplate	romiplostim	Amgen	04/02/2009	Facteur de croissance hématopoïétique : G-CSF
Nulojix	bélatcept	Bristol-Myers Squibb	17/06/2011	Autres : Protéine de fusion
Nutropin AQ	somatropine	Ipsen	19/03/2004	Hormone de croissance : Somatotropine
Omnitrope	somatropine	Sandoz	12/04/2006	Hormone de croissance : Somatotropine
Optaflu	vaccin grippal	GlaxoSmithKline	01/06/2007	Vaccin
Orencia	abatacept	Bristol-Myers Squibb	21/05/2007	Autre : Protéine de fusion
Osigraft	eptotermine alpha	Howmedica international	17/05/2001	Autre : Protéine morphogénique osseuse
Ovitrelle	choriogonadotropine alpha	Merck Serono	02/02/2001	Hormone sexuelle stimulante: Gonadotrophine
Pandemrix	vaccin grippal inactivé fragmenté souche A	GlaxoSmithKline	20/05/2008	Vaccin
Panenza	vaccin grippal inactivé fragmenté souche A	Sanofi Pasteur	16/11/2009	Vaccin
Pegasys	peginterféron alpha	Roche	20/06/2002	Cytokine : Interféron
Pentavac	vaccin diphtérique, tétanique, coquelucheux et conjugué de l'haemophilus type b	Sanofi Pasteur MSD	06/08/1998	Vaccin
Pergoveris	follitropine alpha	Merck Serono	25/06/2007	Hormone sexuelle stimulante: Gonadotrophine
Perjeta	pertuzumab	Roche	04/03/2013	Anticorps monoclonal
Pneumo 23	vaccin pneumococcique polysidique	Sanofi Pasteur MSD	06/12/1996	Vaccin
Pneumovax	vaccin pneumococcique	Sanofi Pasteur	28/03/2001	Vaccin

Nom	Composition	Laboratoire	Date obtention AMM	Classe pharmaceutique
Prevenar	vaccin pneumococcique	Wyeth	02/02/2001	Vaccin
Prevenar 13	vaccin pneumococcique	Pfizer	09/12/2009	Vaccin
Priorix	vaccin rougeoleux, ourlien et rubéoleux	GlaxoSmithKline	25/05/1999	Vaccin
Proleukin	adesleukine	Chiron	15/09/1989	Cytokine
Prolia	dénosumab	Amgen	26/05/2010	Anticorps monoclonal
Pulmozyme	dornase alpha	Roche	10/03/1994	Enzyme
Rabipur	vaccin rabique	Novartis	11/02/2004	Vaccin
Rapilysin	reteplase	Roche	29/08/1996	Enzyme thrombolytique
Ratiograstim	filgrastim	Ratiopharm	15/09/2008	Facteur de croissance hématopoïétique : G-CSF
Rebif	interféron bêta-1a	Merck Serono	04/05/1998	Cytokine : Interféron
Refacto	moroctocog alpha	Pfizer	13/04/1999	Facteur de coagulation
Remicade	infiximab	Johnson & Johnson	13/08/1999	Anticorps monoclonal
Removab	catumaxomab	Fresenius biotech	20/04/2009	Anticorps monoclonal
Reopro	abciximab	Eli Lilly	02/05/1995	Anticorps monoclonal
Repevax	vaccin diphtérique, tétanique, coquelucheux et poliomyélitique	Sanofi Pasteur MSD	04/10/2002	Vaccin
Replagal	algalsidase alpha	Shire France	03/08/2001	Enzyme métabolique
Retacrit	époétine zeta	Hospira France	18/12/2007	Facteur de croissance hématopoïétique : Erythropoïétine
Revaxis	vaccin diphtérique, tétanique et poliomyélitique	Sanofi Pasteur MSD	17/01/2000	Vaccin
Revolade	eltrombopag	GlaxoSmithKline	11/03/2010	Facteur anti-coagulation
Roactemra	tocilizumab	Roche	16/01/2009	Anticorps monoclonal
Rotarix	vaccin à rotavirus	GlaxoSmithKline	01/09/2008	Vaccin
Rotateq	vaccin à rotavirus	Sanofi Pasteur MSD	27/06/2006	Vaccin
Rouvax	vaccin contre la rougeole	Sanofi Pasteur MSD	05/02/1986	Vaccin
Ruconest	conestat alpha	Swedish orphan biovitrum	28/10/2010	Autres
Saizen	somatropine	Merck Serono	03/04/1989	Hormone de croissance: Somatotropine
Scintimun	préparation radiopharmaceutique bésilésomab	Cis bio international	11/01/2010	Anticorps monoclonal
Simponi	golimumab	Janssen	01/01/2009	Anticorps monoclonal
Simulect	basiliximab	Novartis	09/10/1998	Anticorps monoclonal
Soliris	éculizumab	Alexion	20/06/2007	Anticorps monoclonal
Somavert	pegvisomant	Pfizer	13/11/2002	Autre : Antagoniste des récepteurs de l'hormone de croissance
Spirolept	vaccin leptospires inactivé	Imaxio	04/04/1979	Vaccin
Stamaril	vaccin de la fièvre jaune	Sanofi Pasteur MSD	27/01/1986	Vaccin
Stelara	ustékinumab	Janssen Cilag	16/01/2009	Anticorps monoclonal
Synagis	palizumab	Abbott	13/08/1999	Anticorps monoclonal
Tetravac-acellulaire	vaccin diphtérique, tétanique, coquelucheux et poliomyélitique	Sanofi Pasteur MSD	02/12/1998	Vaccin
Tevagrastim	filgrastim	Teva santé	15/09/2008	Facteur de croissance hématopoïétique : G-CSF
Thyrogen	thyropine alpha	Genzyme	09/03/2000	Hormone : Autre
Ticovac adultes	vaccin de l'encéphalite à tiques	Baxter	28/09/2004	Vaccin
Ticovac enfants	vaccin de l'encéphalite à tiques	Baxter	07/03/2005	Vaccin

Nom	Composition	Laboratoire	Date obtention AMM	Classe pharmaceutique
Twinrix adulte	vaccin combiné hépatite A et B	GlaxoSmithKline	20/09/1996	Vaccin
Twinrix pédiatrique	vaccin combiné hépatite A et B	GlaxoSmithKline	10/02/1997	Vaccin
Tyavax	vaccin de l'hépatite A et typhoïdique	Sanofi Pasteur MSD	24/02/2003	Vaccin
Typherix	vaccin typhoïdique polysidique	GlaxoSmithKline	16/04/1999	Vaccin
Typhim Vi	vaccin typhoïdique polysidique	Sanofi Pasteur MSD	28/11/1988	Vaccin
Tysabri	natalizumab	Elan pharma	27/06/2006	Anticorps monoclonal
Umatrope	somatropine	Eli Lilly	21/11/1995	Hormone de croissance: Somatotropine
Uplyso	taliglucérase alpha	Pfizer	30/08/2010	Enzyme
Varilrix	vaccin varicelleux	GlaxoSmithKline	26/12/2003	Vaccin
Vaxigrip	vaccin grippal inactivé à virion fragmenté	Sanofi Pasteur MSD	15/06/1998	Vaccin
Vectibix	panitumumab	Amgen	03/12/2007	Anticorps monoclonal
Viraferon PEG	peginterféron alpha-2b	Schering Plough	29/05/2001	Cytokine : Interféron
VPRIV	vélaglucérase alpha	Shire France	26/08/2010	Enzyme
Xgeva	dénosumab	Amgen	13/07/2011	Anticorps monoclonal
Xolair	omalizumab	Novartis	25/10/2005	Anticorps monoclonal
Yervoy	ipilimumab	Bristol-Myers Squibb	13/07/2011	Anticorps monoclonal
Zaltrap	aflibercept	Sanofi	01/02/2013	Autre
Zarzio	filgrastim	Sandoz	06/02/2009	Facteur de croissance hématopoïétique : G-CSF
Zevalin	ibritumomab tiuxétan	Schering AG	16/01/2004	Anticorps monoclonal
Zomacton	somatropine	Ferring AB	26/02/1992	Hormone de croissance: Somatotropine

ANNEXE 2 : Les méthodes analytiques rencontrées en biotechnologie

Les protéines et peptides thérapeutiques, qu'ils soient microencapsulés ou non, doivent être strictement contrôlés afin de vérifier le bon respect du cahier des charges. Aux étapes de développements de la formulation et du procédé de production, ils permettent de vérifier l'impact de tout changement sur la qualité du produit, et permettent de définir une date de péremption. Plusieurs techniques analytiques sont utilisées afin de contrôler cela. Elles permettent par exemple de déceler les impuretés ainsi que les agrégats apparus à tout stade du cycle de vie du médicament. L'un comme l'autre sont susceptibles soit d'être toxiques une fois administrés chez l'homme, soit d'engendrer une perte de l'activité thérapeutique. Le développement analytique est très étroitement lié à l'élaboration de la formulation de protéines et peptides thérapeutiques,. En effet, les analyses analytiques permettent de démontrer que la protéine est stable dans sa formulation, à l'instant t ou au cours du temps. Les principales analyses analytiques sont détaillées ci-dessous.

Les analyses chromatographiques

RP HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance, Phase inverse)

Cette technique permet de séparer les protéines selon leur degré d'hydrophobicité.

La phase stationnaire au niveau de la colonne chromatographique est composée de silice sur laquelle sont greffés des groupements apolaires et hydrophobes. Elle interagit donc avec les groupements hydrophobes de la protéine. La phase mobile est très généralement un acide organique contenant un mélange d'ions. Elle va élué et décrocher les protéines de la phase stationnaire au fur et à mesure que sa concentration est augmentée ou que la composition du solvant change, de sorte que plus une molécule est hydrophobe, plus longtemps elle restera accrochée à la colonne chromatographique. La détection de ces molécules en sortie de colonne peut se faire par spectrométrie UV ou par fluorescence qui sont les deux méthodes de détection les plus connues.

La RP HPLC est utilisée lors des études de stabilité afin d'observer et de caractériser la dégradation de la protéine.

IEC (Chromatographie échangeuse d'ions)

Cette technique permet de séparer les protéines selon leur charge ionique.

Ici, la phase stationnaire au niveau de la colonne chromatographique est une résine chargée en ions connus. Les parties de la protéine de charges opposées à la résine s'associent avec elles via des interactions électrostatiques. La force ionique de l'éluant sera progressivement augmentée afin de décrocher les protéines selon leur charge.

L'IEC est utilisée lors des études de stabilité afin d'observer et de caractériser la dégradation de la protéine.

SEC (Chromatographie par exclusion de taille)

Cette technique permet de séparer les protéines selon leur taille et leur forme. Les plus grosses molécules ne rentrent pas dans les pores de la phase stationnaire et sont élués en premier.

La SEC est utilisée pour déterminer la masse moléculaire d'une protéine et caractériser la population d'agrégats s'il y en a.

L'électrophorèse

SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis)

La méthode SDS-PAGE permet la séparation des particules en fonction de leur poids moléculaire et de ce fait elle permet de visualiser une potentielle agrégation de la protéine. Le b-mercaptoéthanol intervient ici en tant qu'agent dénaturant réduisant les ponts disulfures qui unissaient les différentes sous unités des protéines oligomériques. Chaque sous unité, une fois dissociée, fixe le sodium dodecyl sulfate (SDS) et prend une charge apparente négative. Elles sont ensuite placées sur un gel de polyacrylamide sur lequel est appliqué un courant électrique. Les sous unités de la protéine à étudier migrent vers l'anode et seront séparées les unes des autres en fonction de leur poids moléculaire.

Le focus isoélectrique

Le focus isoélectrique (IEF) est utilisé afin de déterminer le pI de la protéine ou de définir son degré de pureté. Un gradient de pH est établi le long du gel d'électrophorèse. Avec l'application d'un courant électrique sur le gel, les protéines déposées sur celui-ci migrent à travers ce gradient de pH jusqu'à ce qu'elles atteignent leur pI. A $pH = pI$, les charges totales de la protéines sont égales à 0. La protéine ne migre donc plus dans le gel. [81]

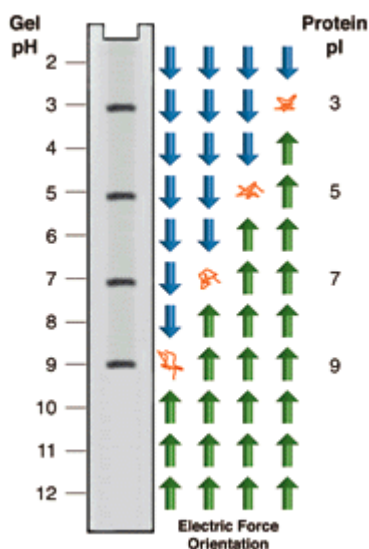


Figure 26 : Le focus isoélectrique (image extraite du site internet www.nationaldiagnostics.com, consulté le 11/05/2016)

Un gel bi-dimensionnel 2D PAGE (IEF couplé SDS page) peut ainsi donner des informations à la fois sur la taille et sur le pI de la protéine.

L'électrophorèse capillaire

Le problème des méthodes électrophorétiques est que l'application d'un courant électrique génère de la chaleur et peut endommager la protéine et ainsi biaiser les résultats. Dans l'électrophorèse capillaire, le très faible diamètre des capillaires permet la dissipation de la chaleur. L'autre avantage

de cette technique est la faible quantité de protéine requise pour l'analyse. Elle sépare les protéines selon le ration m/z (masse/charge).

La spectroscopie

La spectroscopie UV

Le spectre d'absorption d'une protéine dans l'UV se situe entre 175 et 350 nm.

Partie de la protéine absorbant la lumière	Rang d'absorption
Groupes carbonyles des liaisons peptidiques	190-215 nm
AA aromatiques	250-320 nm
Ponts disulfures	250-300 nm

Tableau 27 : Rang d'absorption des différentes parties d'une protéine

Cette méthode permet de mesurer en routine dans une formulation la concentration protéique si la protéine est présente à hauteur de 0.1mg/mL ou plus. Elle ne requiert pas de courbe d'étalonnage si son coefficient d'extinction molaire est connu.

La spectrométrie UV peut également mesurer l'agrégation des protéines étant donné que celles-ci dispersent la lumière à 300-350 nm.

La fluorométrie

La fluorescence est une émission de lumière fluorescente par une molécule appelée « fluorophore » lorsque celle-ci est excitée à travers l'absorption d'énergie lumineuse. Dans le cas des protéines, la plupart émettent de la fluorescence sous 300-400 nm lorsqu'elles sont excitée à 250-300 nm. Les acides aminés aromatiques (Phénylalanine, Tryptophane, Tyrosine) sont en effet des fluorophores naturels. Leur capacité à émettre la lumière fluorescente suit cet ordre : Trp > Tyr > Phe.

Cette méthode analytique est plus sensible que la spectrométrie UV pour déterminer la conformation d'une protéine, autrement dit sa structure tertiaire.

L'intérêt de cette méthode est surtout de monitorer les changements de conformation de la protéine. A titre d'exemple d'application, l'évolution de l'intensité de la fluorescence émise indique un potentiel dépliement ou repliement de la protéine. Les résidus de tryptophane sont hydrophobes et donc généralement présents dans le cœur hydrophobe de la protéine repliée, afin d'éviter tout contact avec l'environnement extérieur aqueux. Lorsque la protéine est dépliée, lors d'un phénomène d'agrégation par exemple, l'intensité de la fluorescence augmente par conséquent. Le transfert d'énergie (FRET) permet d'appréhender les interactions moléculaires ainsi que la diffusion spatiale intracellulaire des protéines. Il évalue la distance entre deux molécules portant un fluorophore.

Le dichroïsme cellulaire

La lumière polarisée se décompose en 2 parties : la polarisation circulaire droite (PCD) et la polarisation circulaire gauche (PCG). Une molécule possédant un dichroïsme circulaire absorbera plus rapidement l'une des deux composantes. Les acides aminés (sauf la glycine) sont asymétriques de par la présence de carbone chiraux. De ce fait les polypeptides sont dits optiquement actifs et présentent ce dichroïsme circulaire.

La technique de dichroïsme circulaire mesure l'inégale absorbance entre PCD et PCG, pour chaque longueur d'onde.

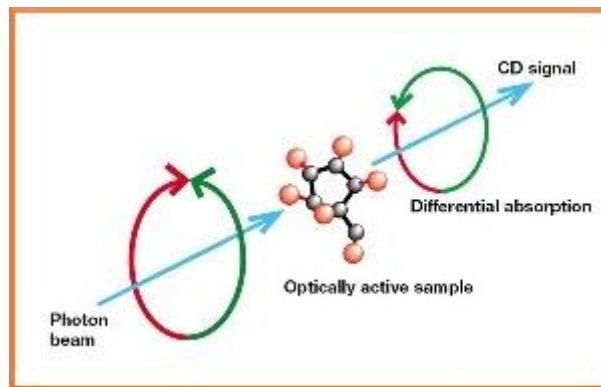


Figure 27 : Le dichroïsme cellulaire, image extraite du site internet du CNRS d'Orléans [29]

La zone d'absorption de la liaison peptidique se situe dans l'UV lointain (180-260nm). La mesure du DC dans cette zone donne ainsi des informations sur la structure secondaire de la protéine (proportion en feuillets β , hélices α ou autre).

La dénaturation d'une protéine ainsi que son processus inverse est également observable. De ce fait le suivi des modifications de la conformation de la protéine peut être effectué en faisant varier son environnement (température, pH, isotonie etc...)[82].

Les méthodes chimiques, de spectrométrie de masse et de transport de masse hydrodynamique ne seront pas abordées plus en détail. Cependant, les protéines et peptides thérapeutiques sont relativement instables dans le PLGA dû à la nature hydrophobe de ce copolymère et à l'acidité de ces produits de dégradation. De plus, une partie des protéines n'est pas à l'intérieur des microsphères mais se trouvent adsorbées à leur surface. Elles sont donc libérées de manière subite et importante juste après l'administration. Ce mécanisme est appelé « l'effet *burst* » et conduit à une toxicité dose-dépendante et une diminution de la durée totale de libération de la protéine.

ANNEXE 3 : Biomédicaments formulés avec des microsphères de PLGA

- Exemples

- Microsphères de PLGA développés par la technique de la double encapsulation e/h/e

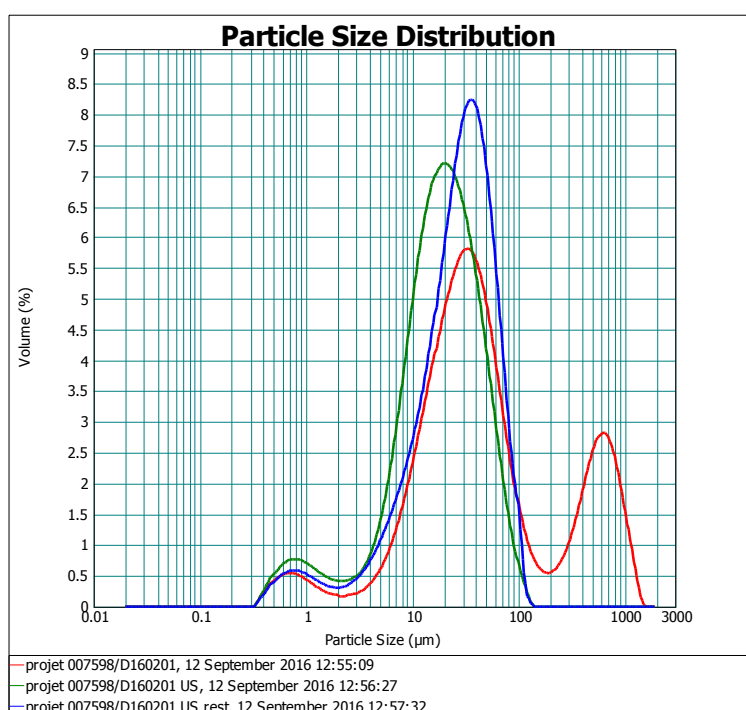
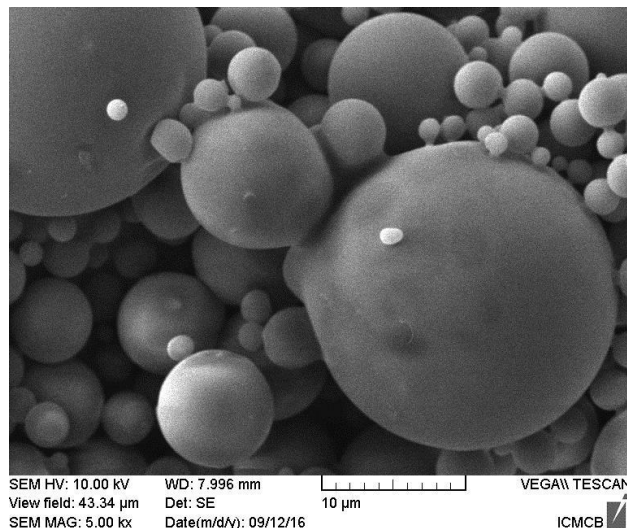
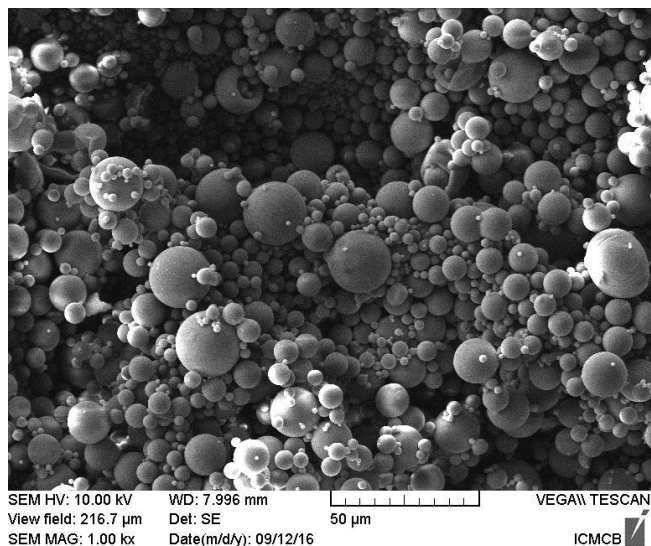
Release profile and characteristics	Burst release (%)	Particle size (µm)	Polymer	Protein encapsulated	Activity of released protein
W/O/W Method					
Slow release to 55% in 15 days	38	75	PLGA	Staphylokinase variant K35R (DGR)	Retain ~85% activity on day 15
Slow release to 65–70% in 14 days	20-55	0.2-167	PLGA	BSA, VEGF	-
Extremely slow release (linearly) to 12% in 30 days	3	46	PLGA	BSA	-
Extremely slow release (linearly) to 16% in 30 days	9	19	PLGA	Lysozyme	-
Extremely slow release to 7.5% in 25 days	5	15	PLA	Ovalbumin	-
Slow release to 29% in 120 days	10	2-8	PLA	Tetanus toxoid (TT)	<i>In vivo</i> serum highest anti-TT antibody titres 164 µg/ml
Slow release to 35% in 40 days	7	-	PLGA,PLA	Insulin	-
Gradual release to ~55% in 60 days	20	2	PLGA	Human chorionic gonadotropin (hCG)	Serum IgG antibody responses up to 12 weeks
Gradual release to ~85% in 35 days	33	28	PLGA	BSA	-
Gradual release to 90–100% in 24 days	25-55	17-20	PLGA	BSA	Denatan sulfate reduced insoluble BSA formation
Gradual release to 45–70% in 34 days	20-40	17-24	PLGA	Insulin	Chondroitin sulfate A preserved secondary structure of insulin up to 20 days
Gradual release to 60% in 11 days	22	75	PLA	recombinant human epidermal growth factor	Gastric ulcer was cured 82% at day 11 after administration with dose of 220 µg/kg
Gradual release to 63–84% in 30 days	25-43	46-110	PLGA	Interferon α2b (IFN α2b)	-
Gradual release to 80% in 190 days	41	1.6-2	PLGA	SPf66 malarial antigen	Retain <i>in vivo</i> activity up to week 27
Continuous release to 45% in 45 days	<1	78	PLGA and chitosan	BSA	-
Continuous release to 87–95% in 20 days	4-26	35-105	Acetylated pullulan	Exenatide	No peptide degradation up to day 16
Nearly zero order release to 95% in 65 days	<5	24	PLGA	Lysozyme	Retain 90% of bioactivity on day 60
A slow and sustained release of the protein over 20 days without a significant initial burst release	-	0.4-1.6	PLGA	Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)	Sustained degradation of fibronectin up to 10 days

- Formulations de microsphères de PLGA approuvées cliniquement

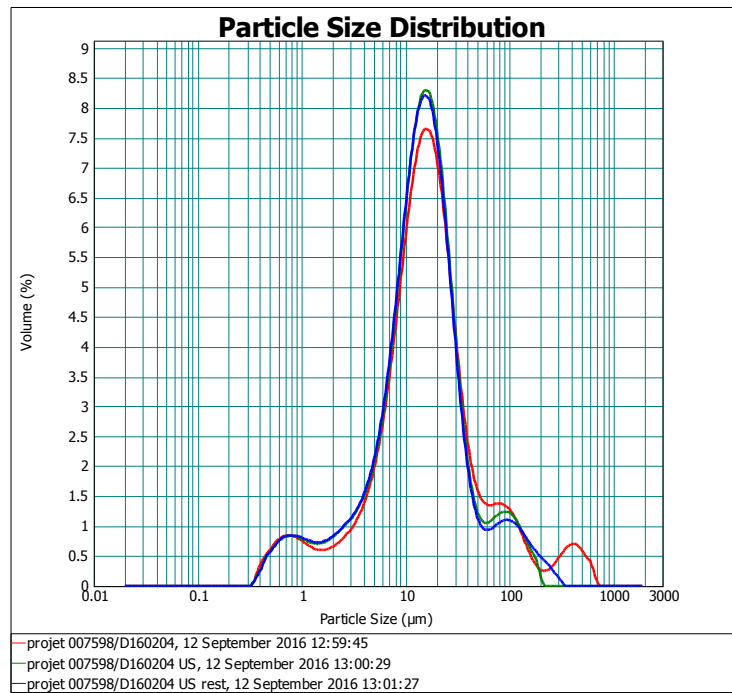
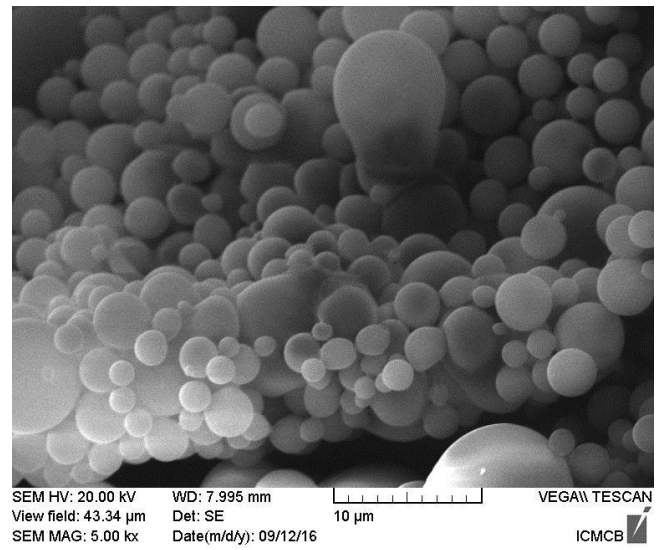
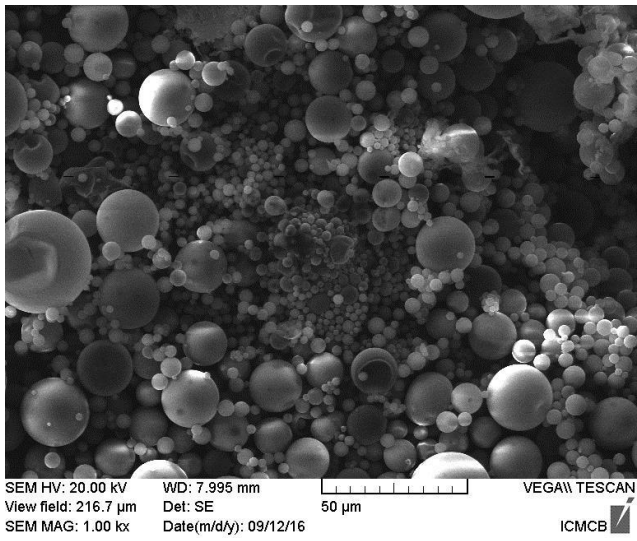
Trade name	Drug	Indications	Delivery System	Length of release	Approval year
Lupron Depot® (TAP)	Leuprolide	Prostate cancer, endometriosis	Injectable PLGA microparticles (intramuscular injection)	1-, 3- and 4-month formulations	1989
Sandostatin® LAR® (Novartis)	Octreotide	Acromegaly	Injectable PLGA microparticles (intramuscular injection)	1-month	1998
Somatuline® LA (Ipsen)	Lantreotide	Acromegaly	Injectable PLGA microparticles (intramuscular injection)	10-14 days	1998
Nutropin Depot® (Alkermes/Genentech)	Human growth hormone (hGH)	Growth hormone deficiency	Injectable PLGA microparticles (subcutaneous injection)	1-month	1999
Trelstar Depot® (Debiopharm)	Triptorelin	Prostate cancer	Injectable PLGA microparticles (intramuscular injection)	1- and 3- month formulations	2000
Risperdal® Consta® (Alkermes/Janssen)	Risperidone	Schizophrenia	Injectable PLGA microparticles (intramuscular injection)	2 weeks	2003

ANNEXE 4 : Essais de microencapsulation placebo dans des PLGA - Les résultats d'analyse en MEB et granulométrie laser

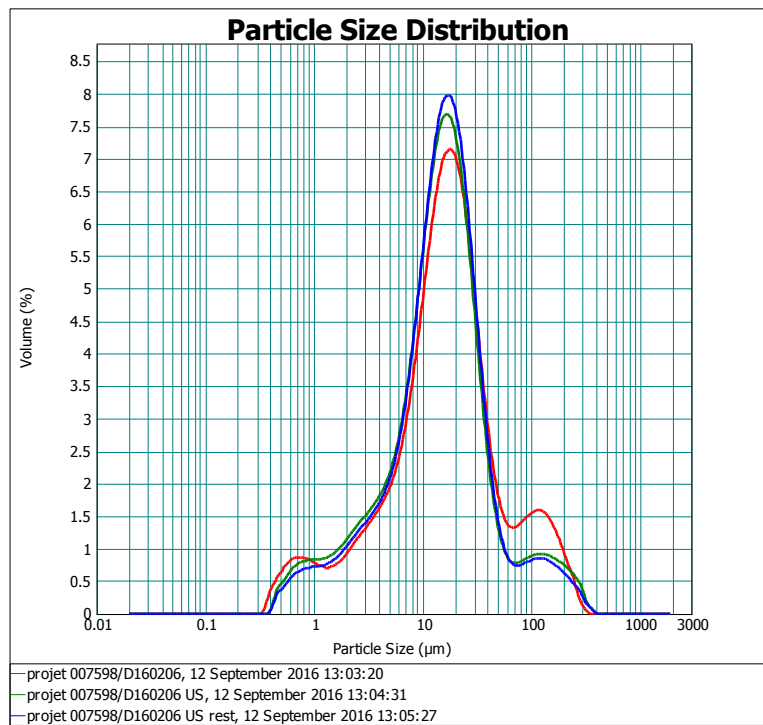
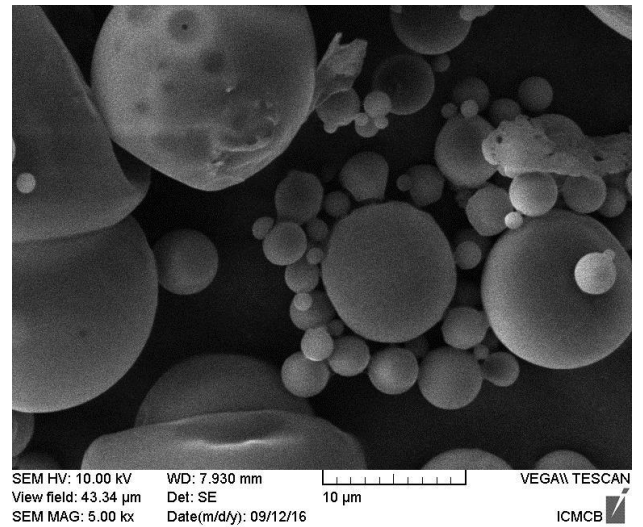
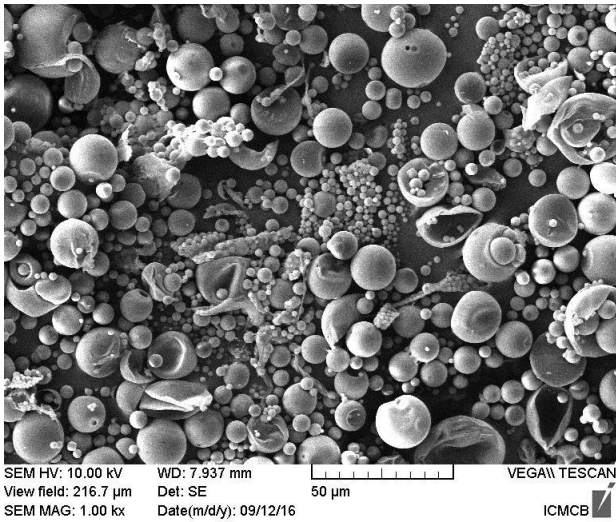
⇒ D160201



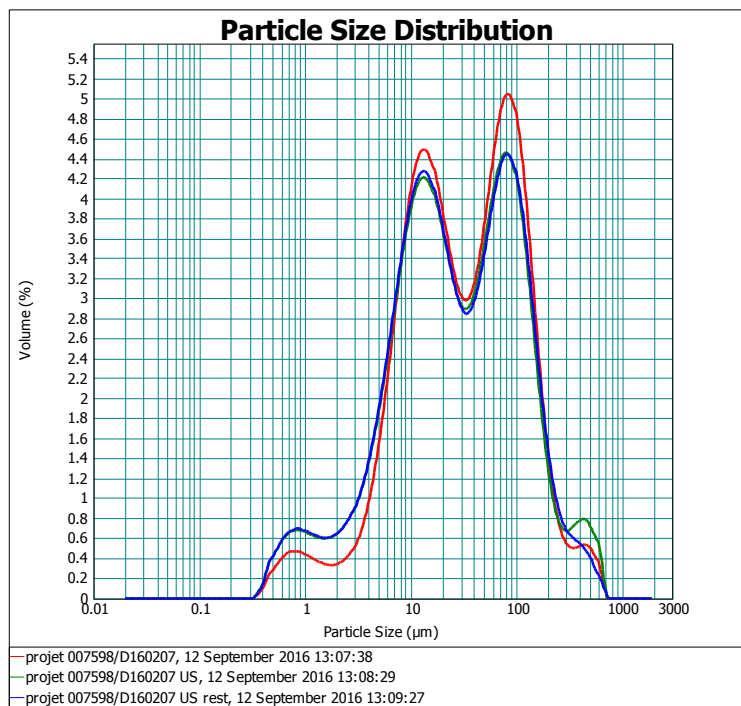
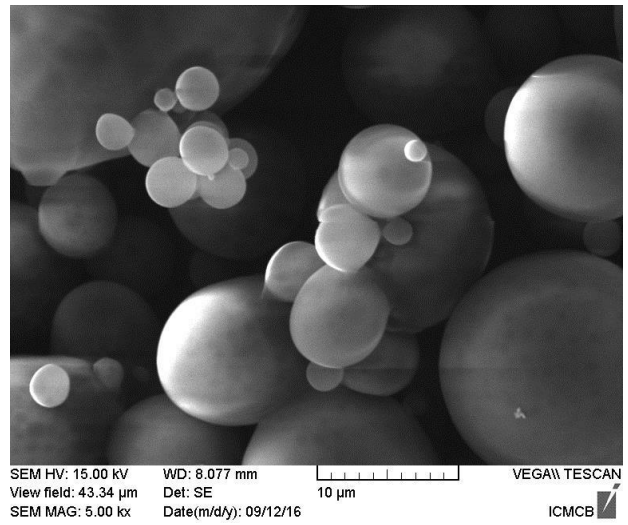
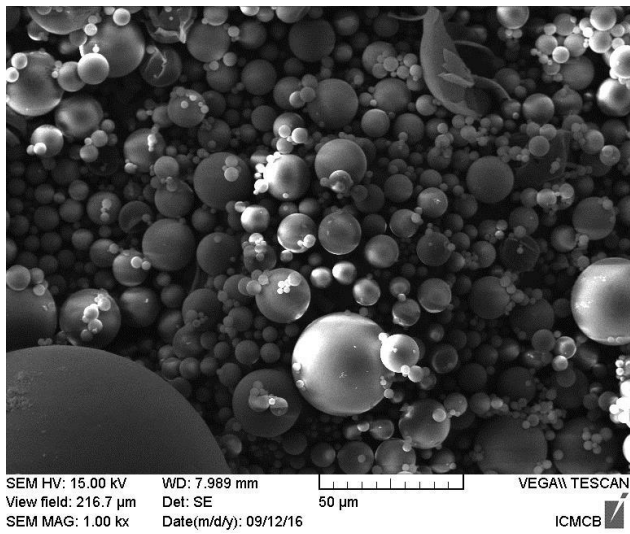
⇒ D160204



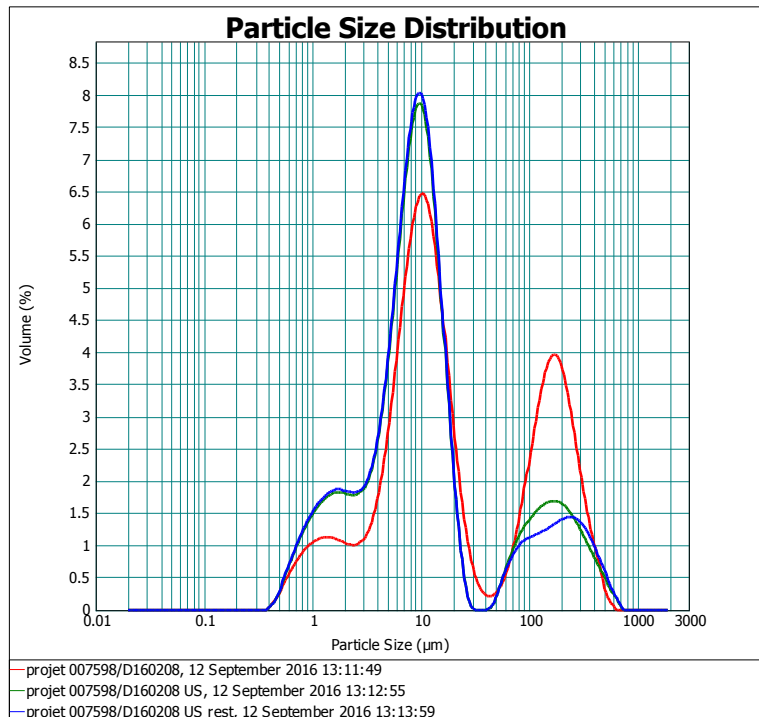
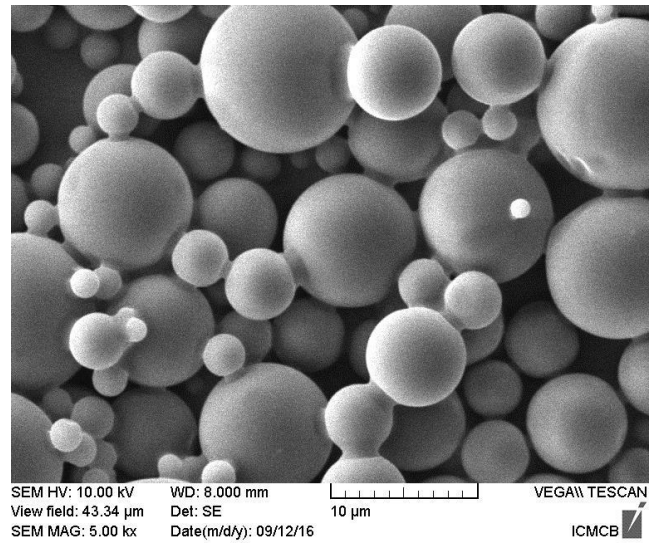
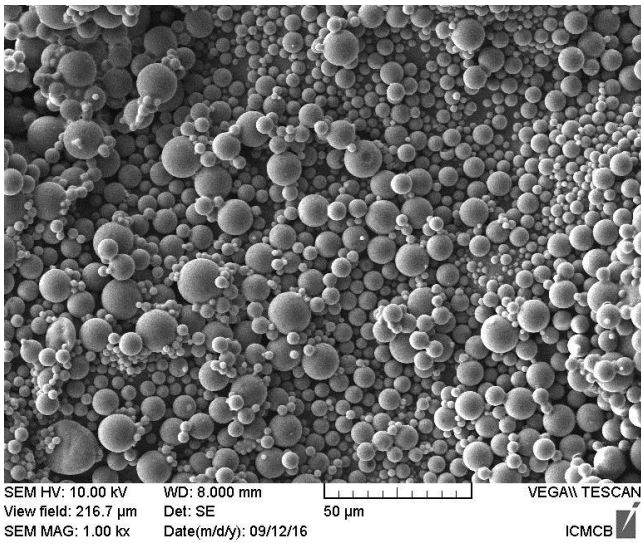
⇒ D160206



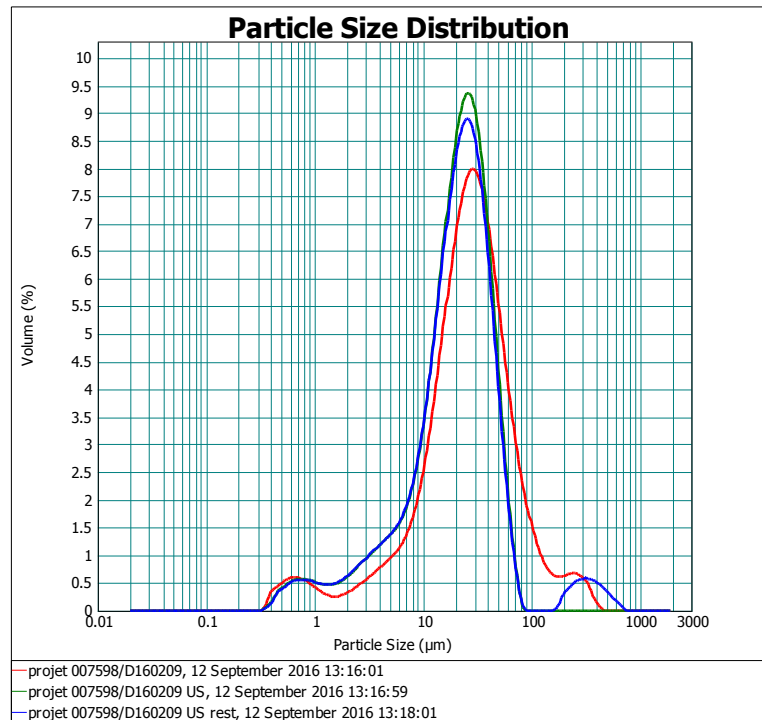
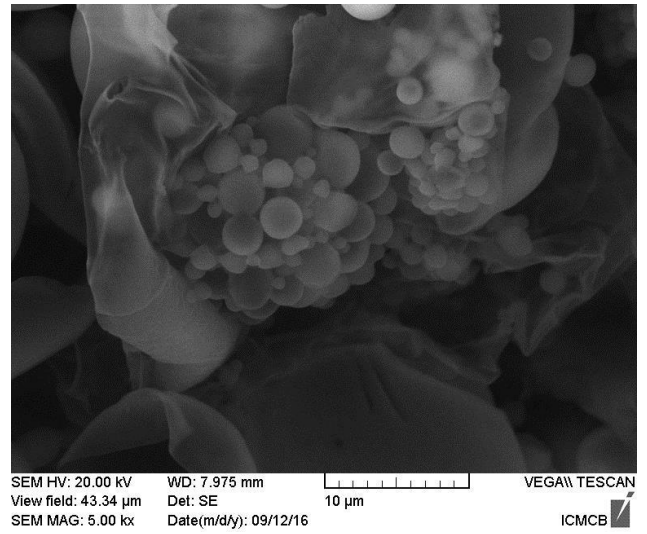
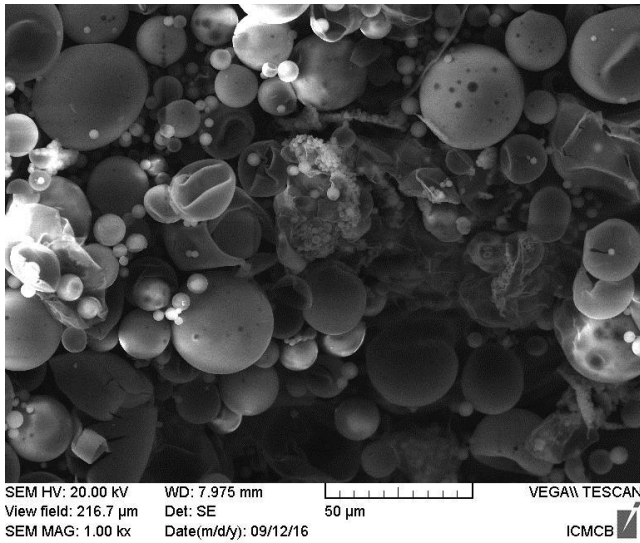
⇒ D160207



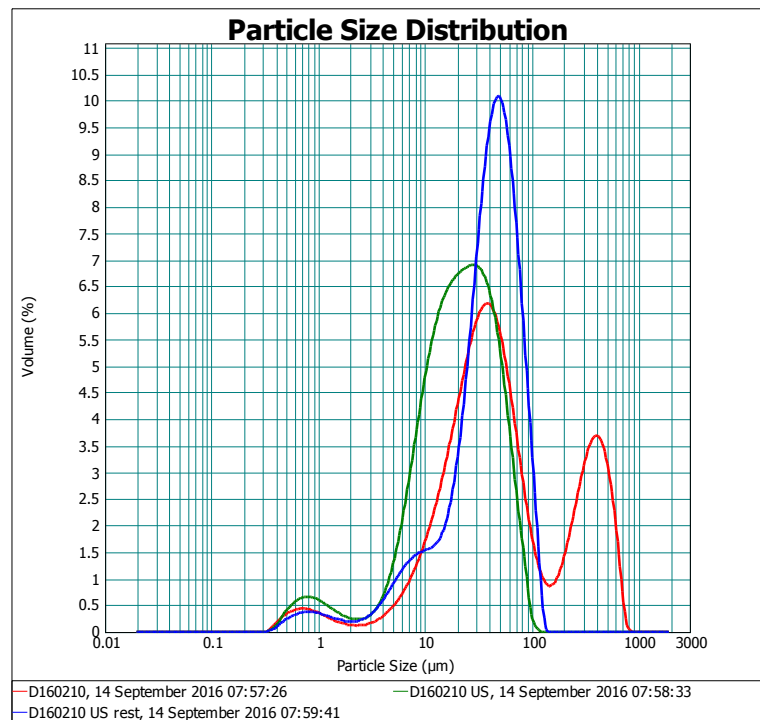
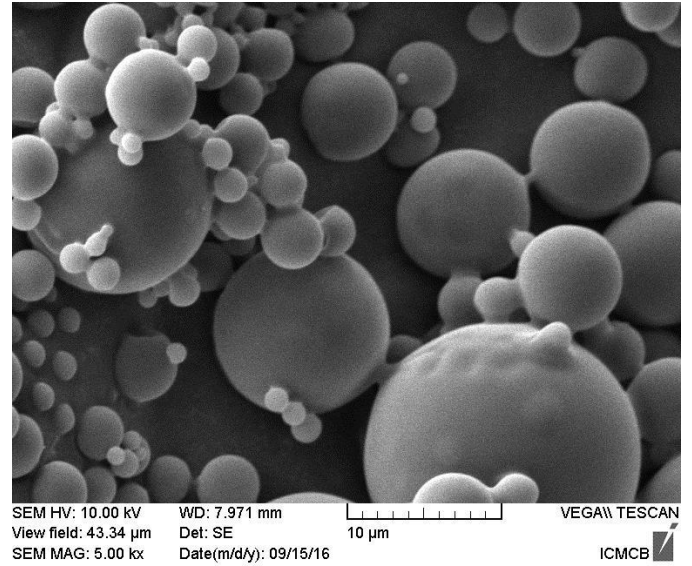
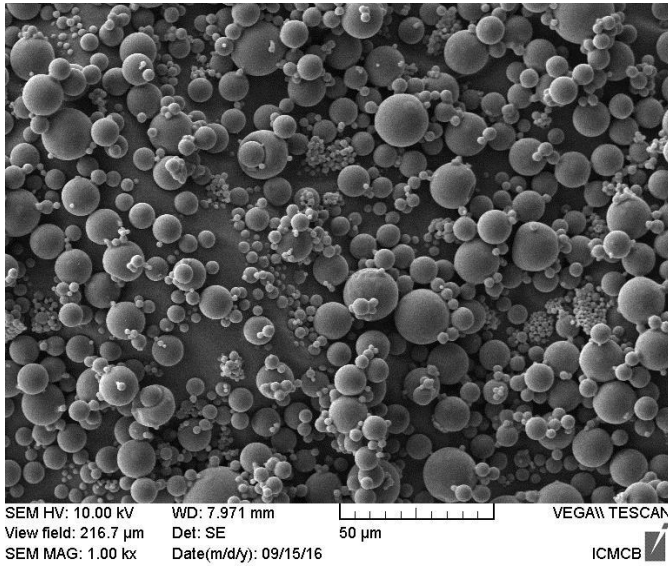
⇒ D160208



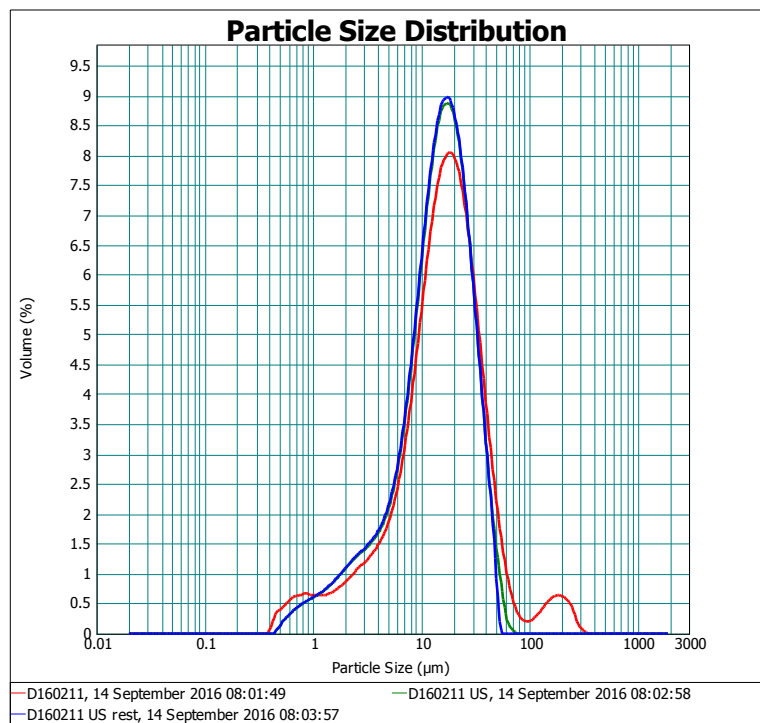
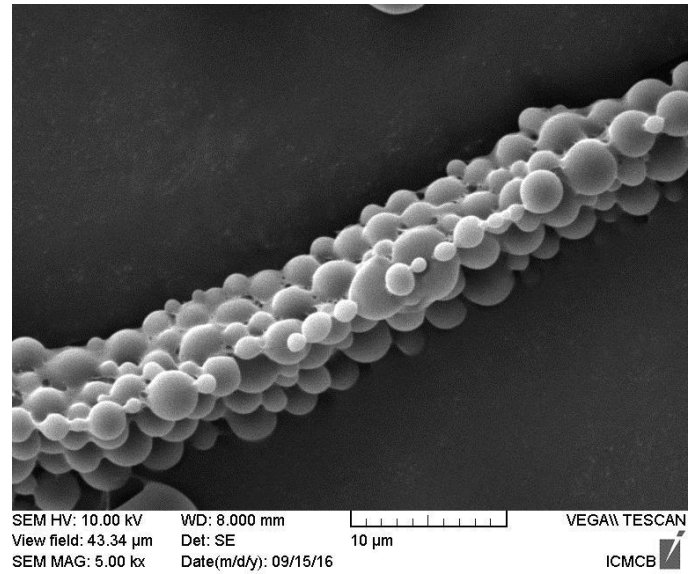
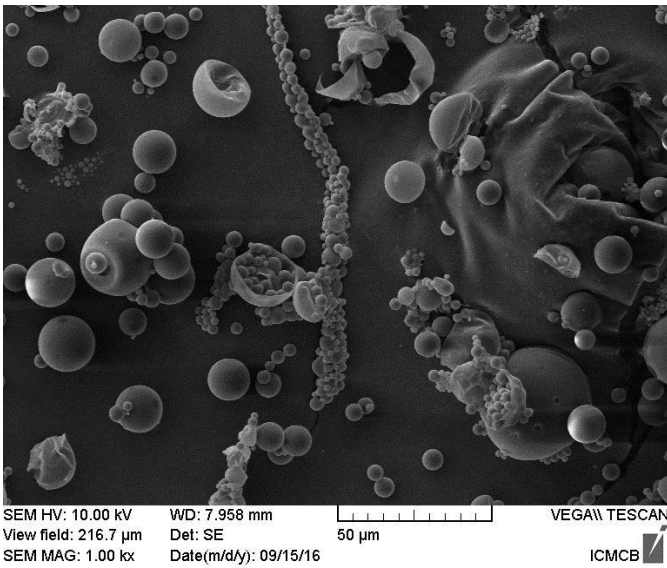
⇒ D160209



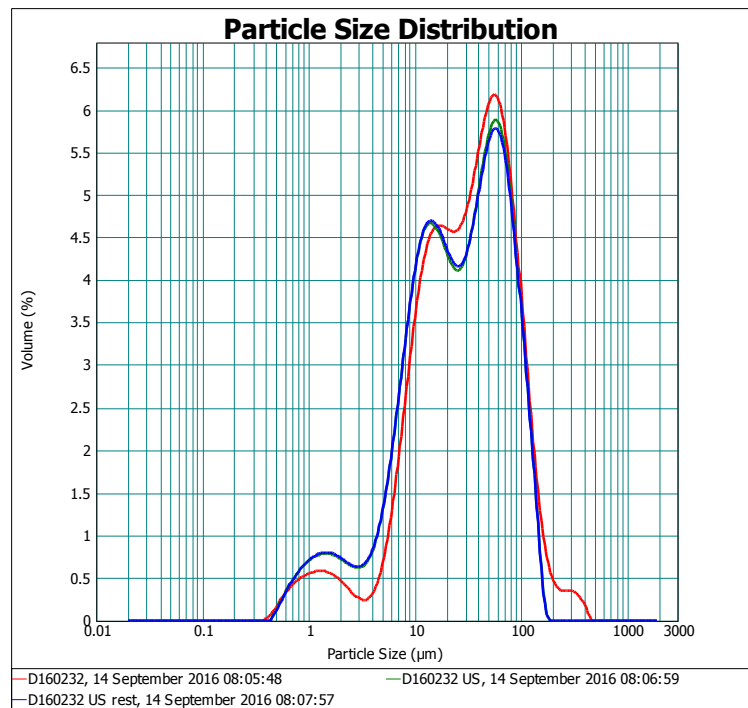
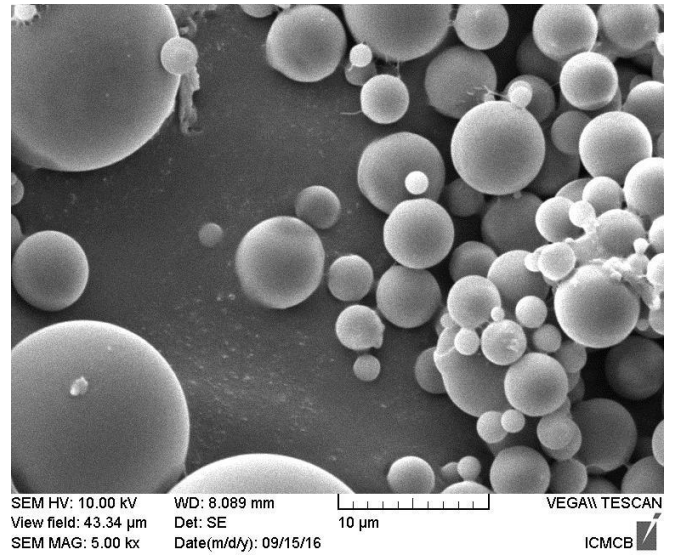
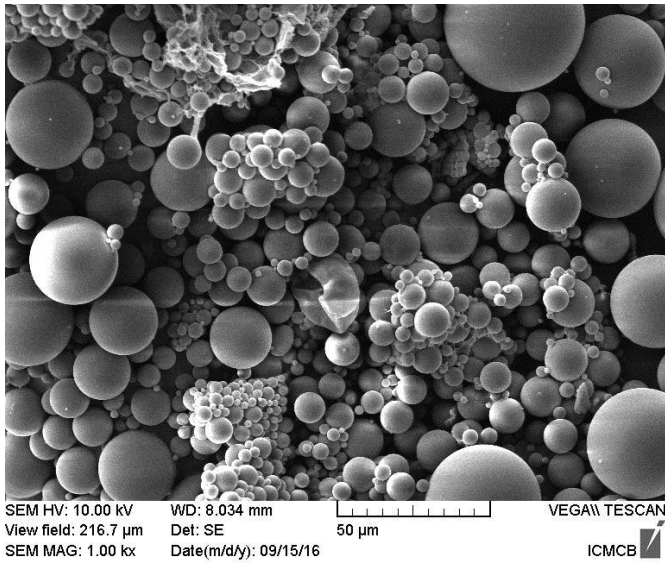
⇒ D160210



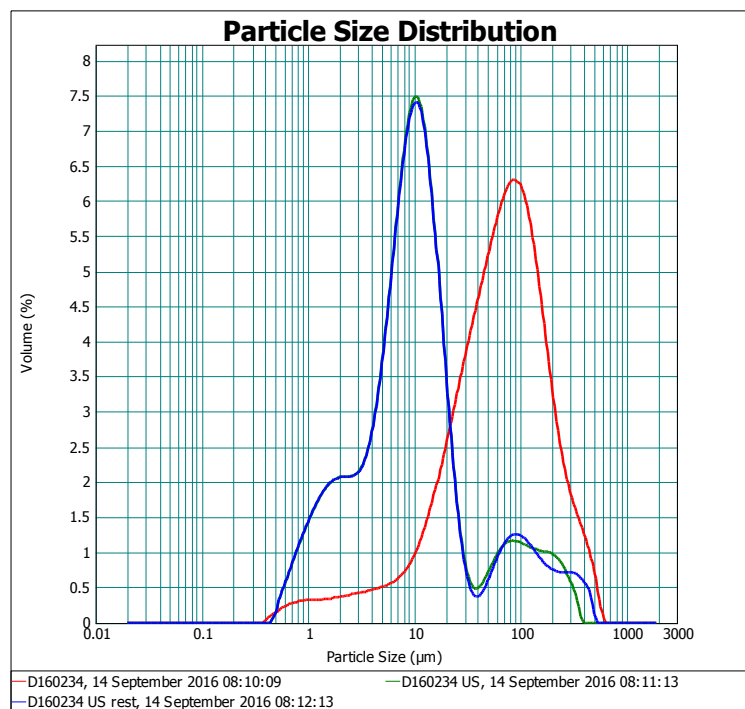
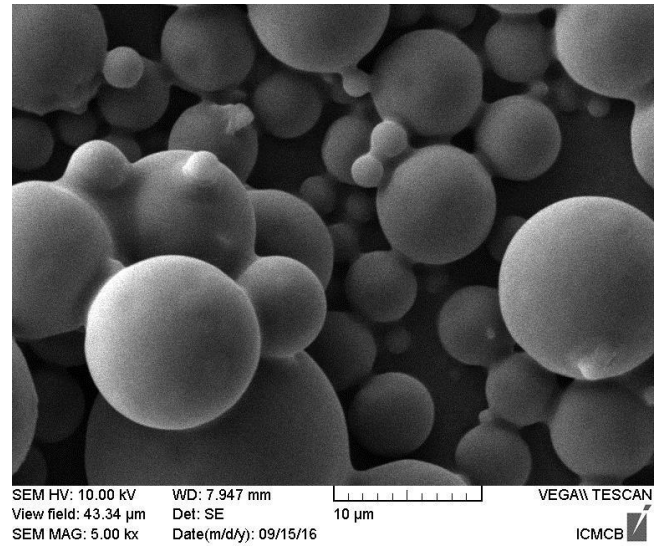
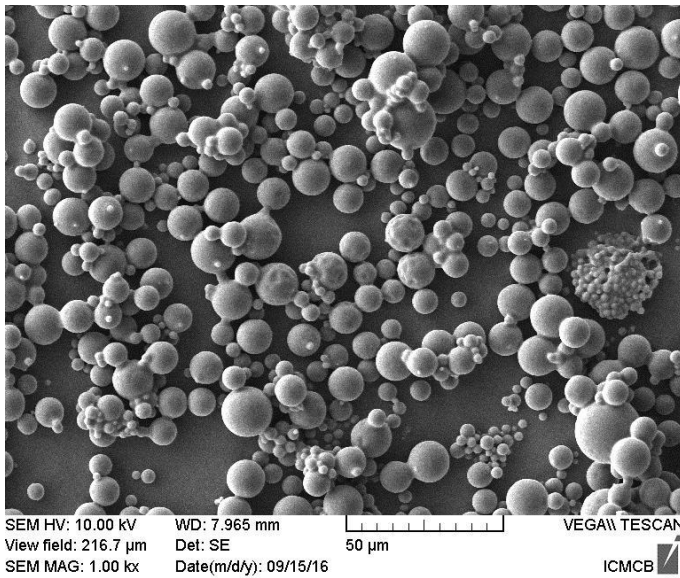
⇒ D160211



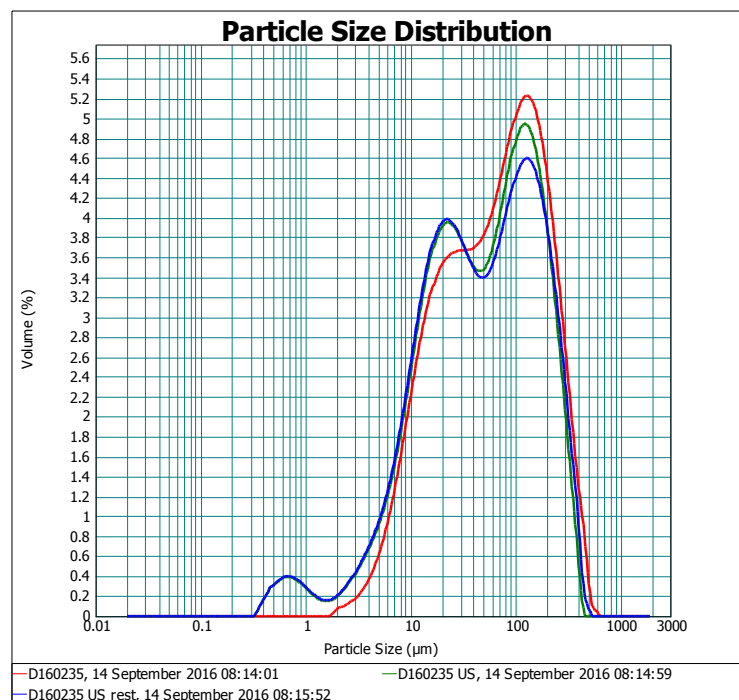
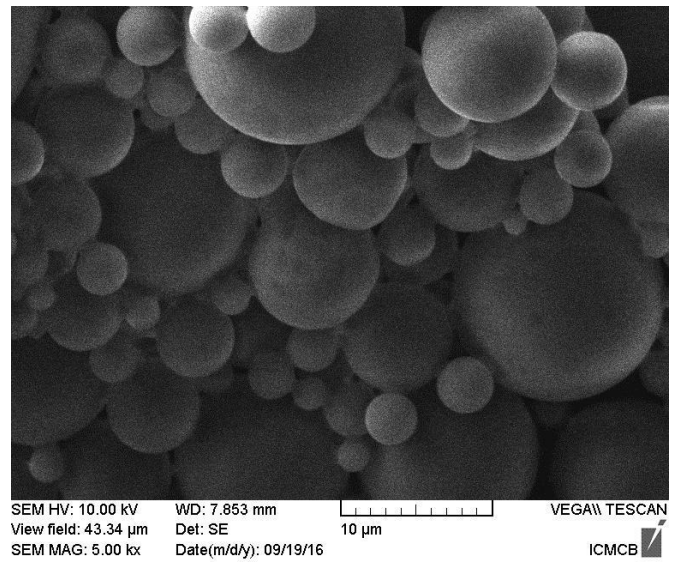
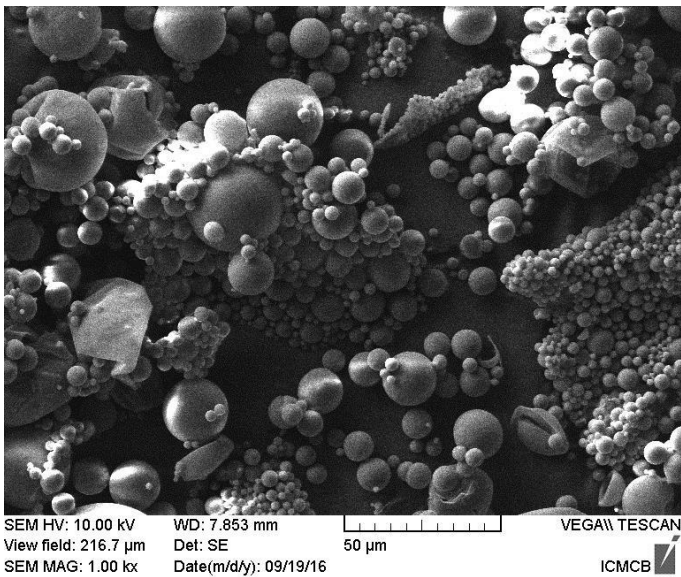
⇒ **D160232**



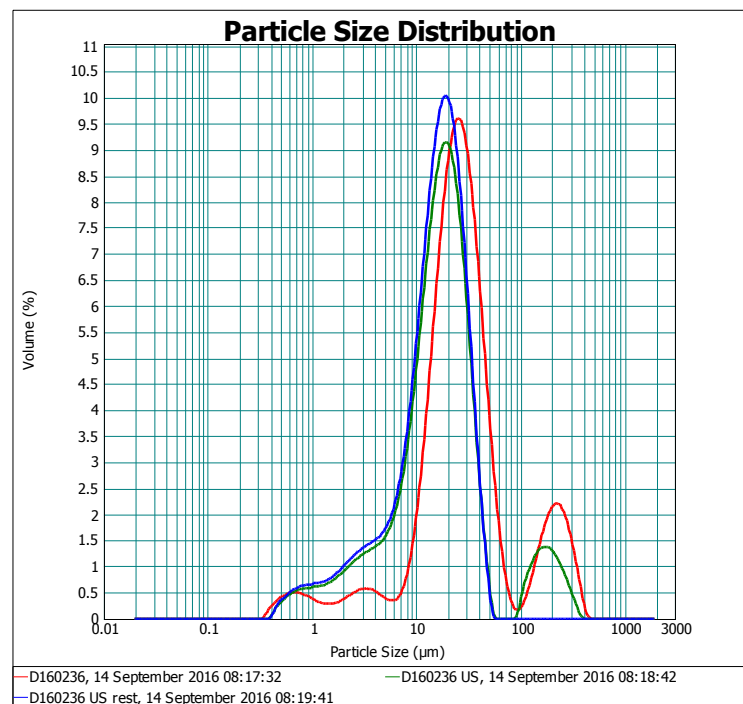
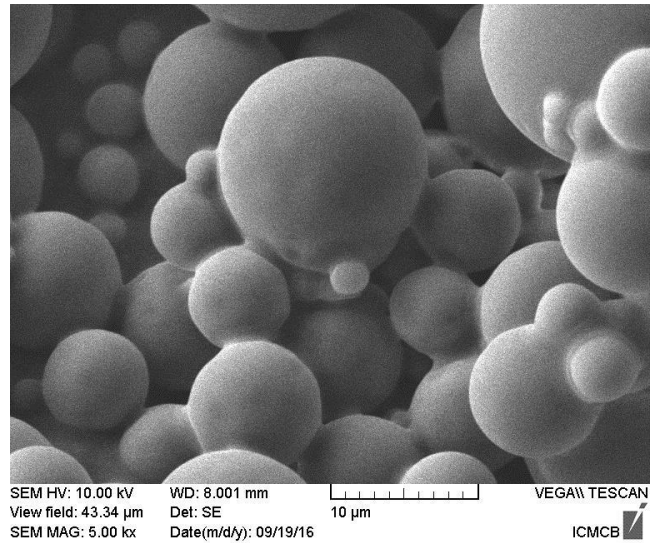
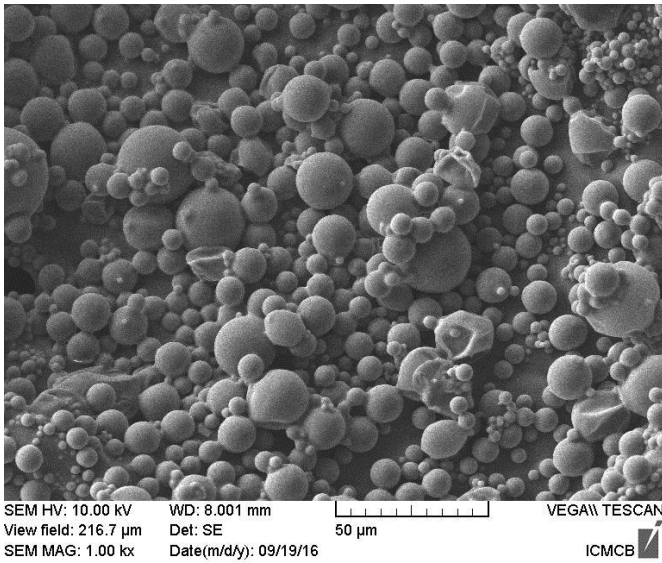
⇒ D160234



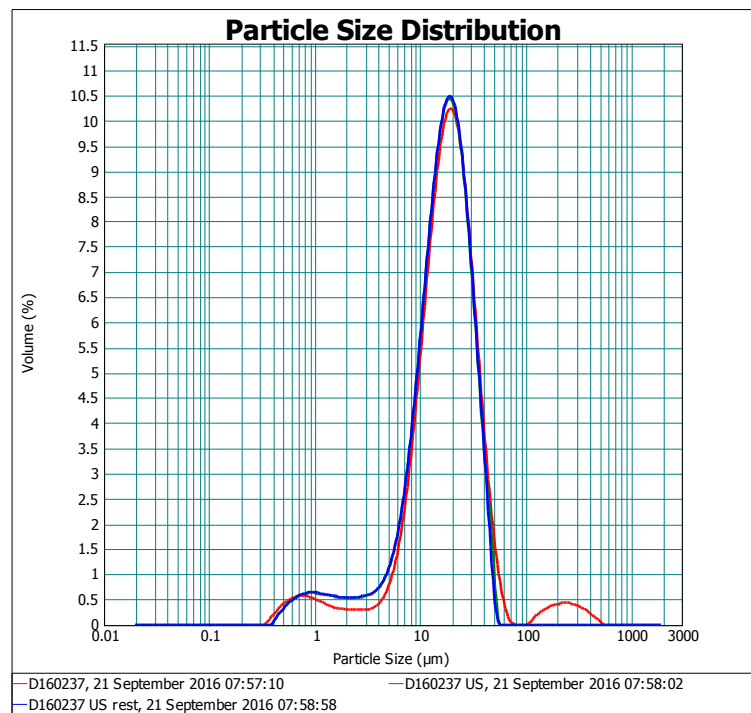
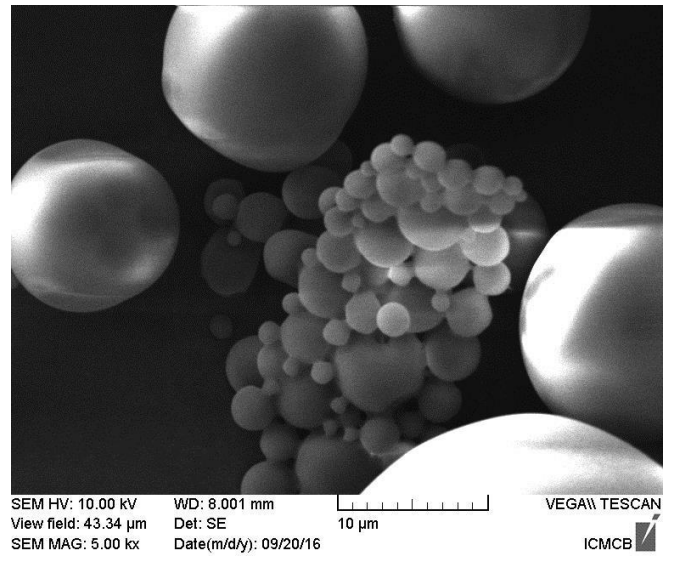
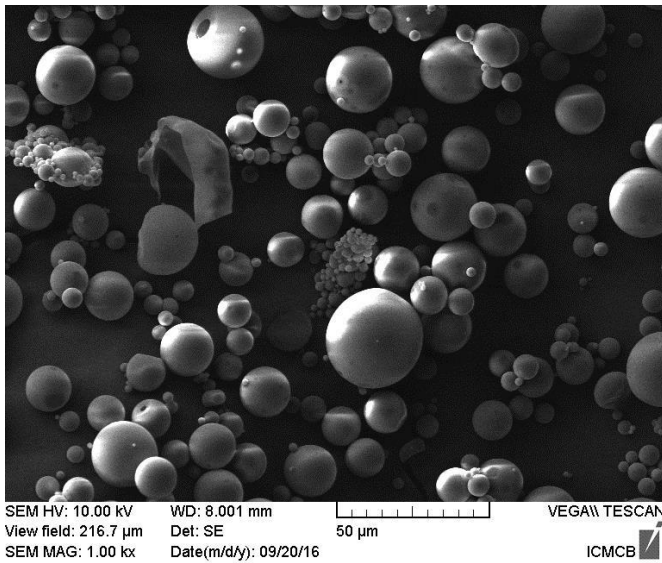
⇒ D160235



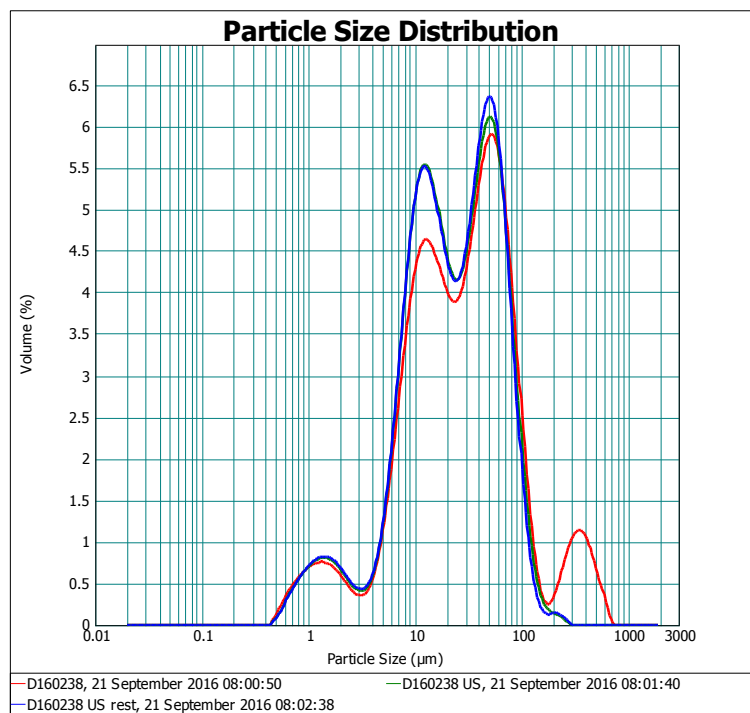
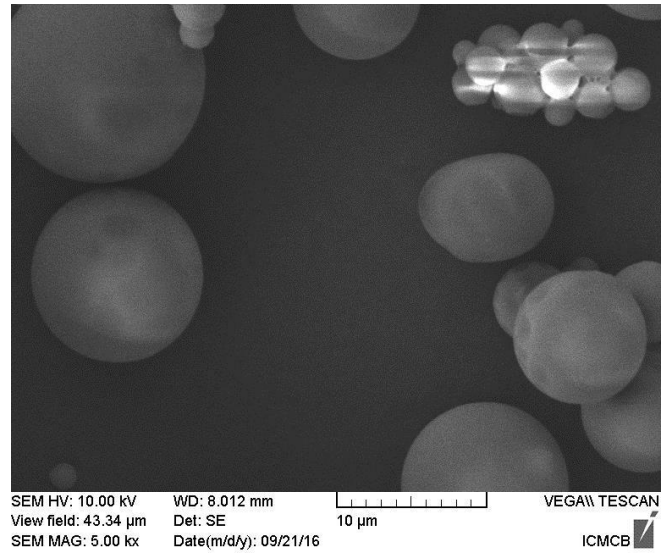
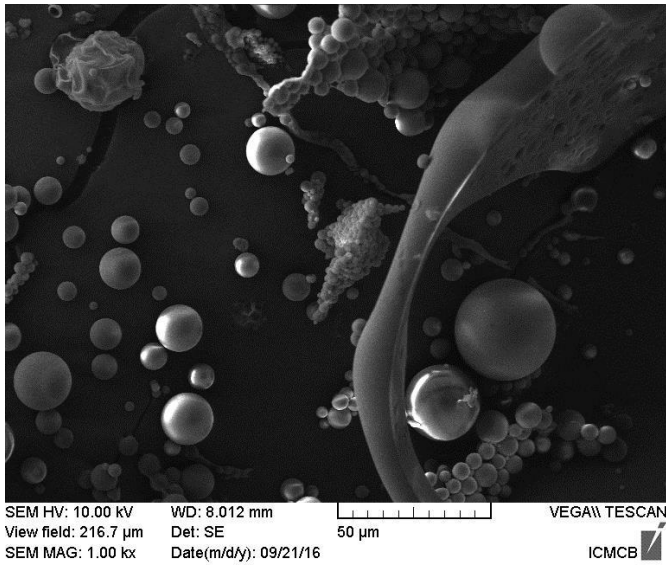
⇒ D160236



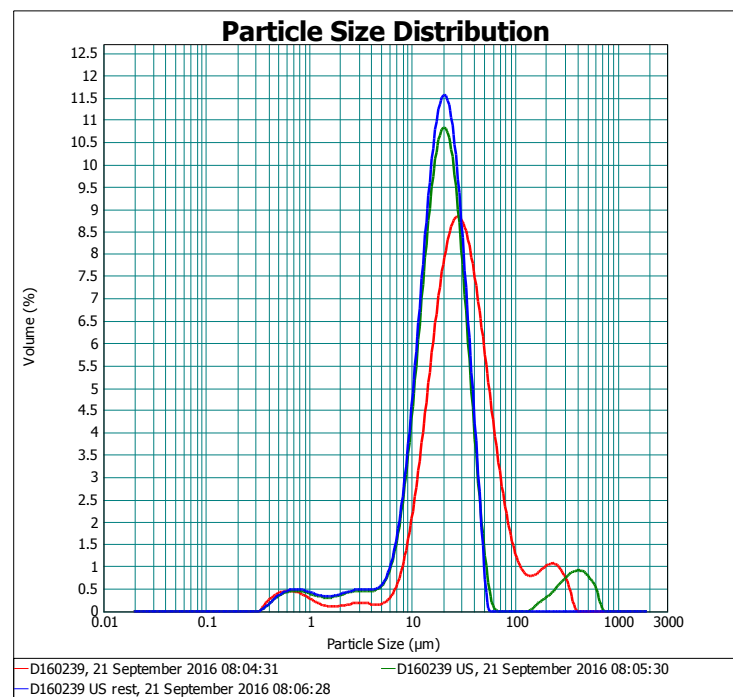
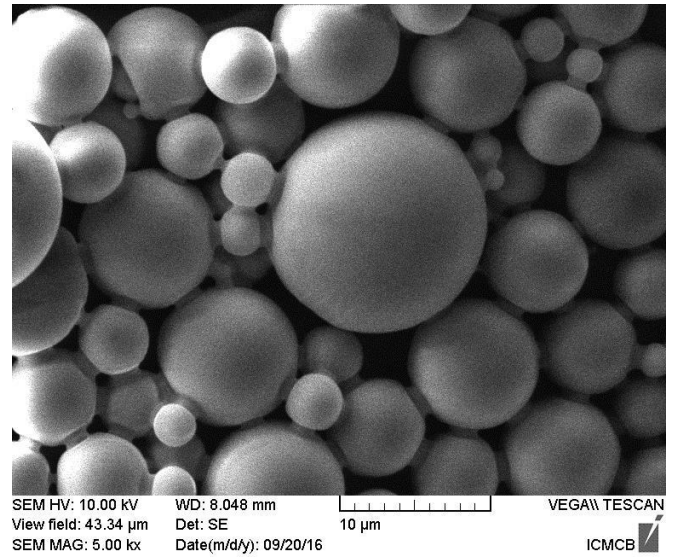
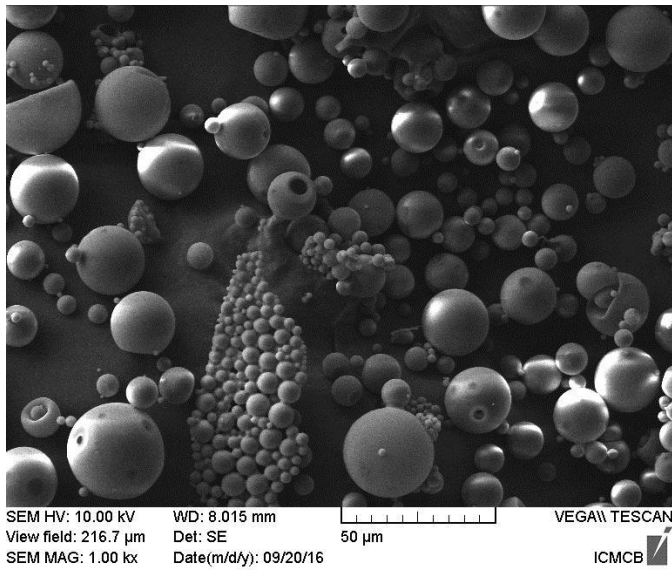
⇒ D160237



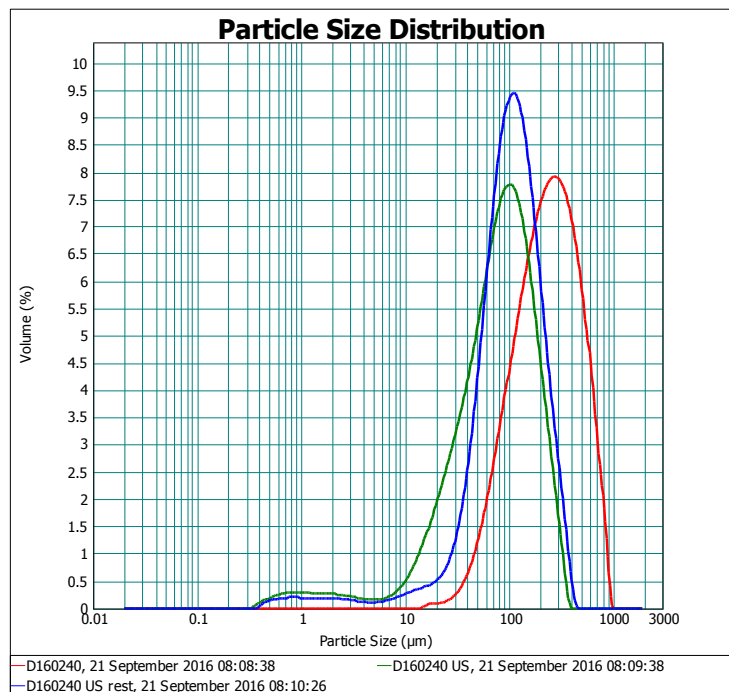
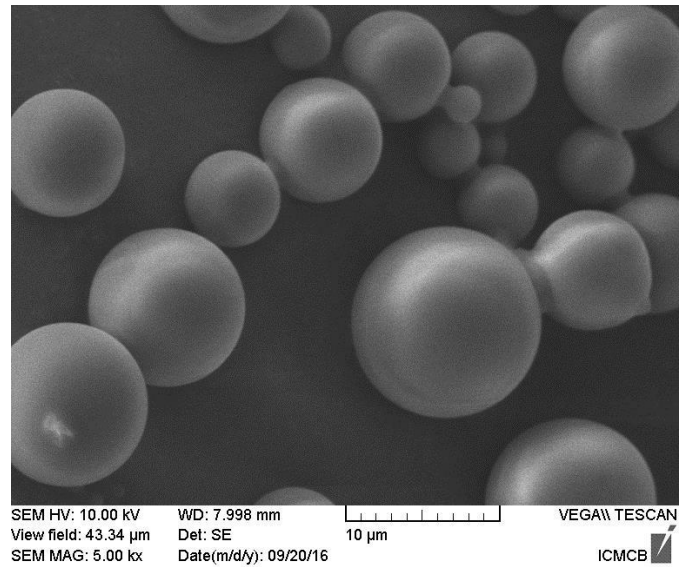
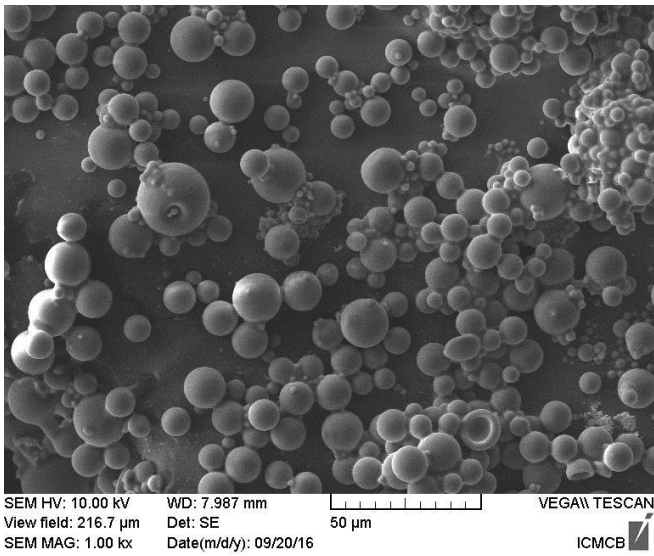
⇒ D160238



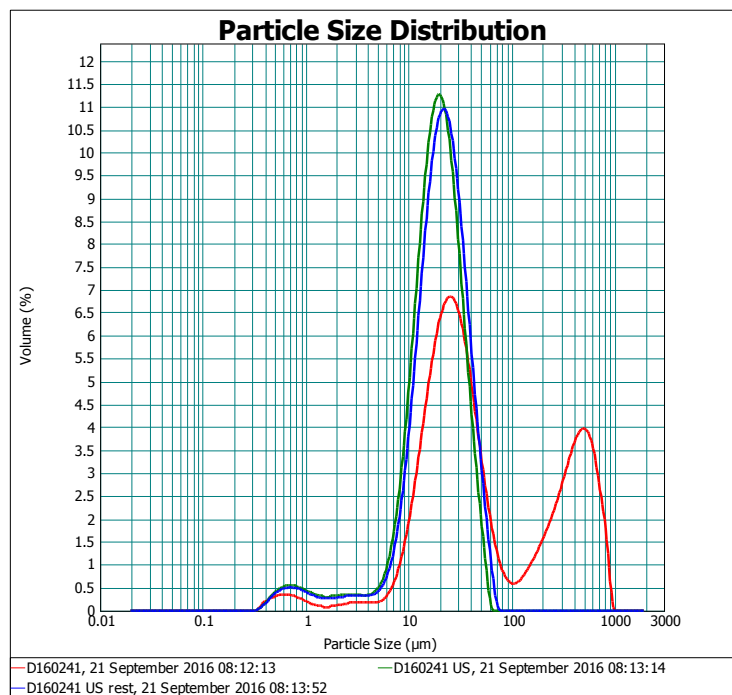
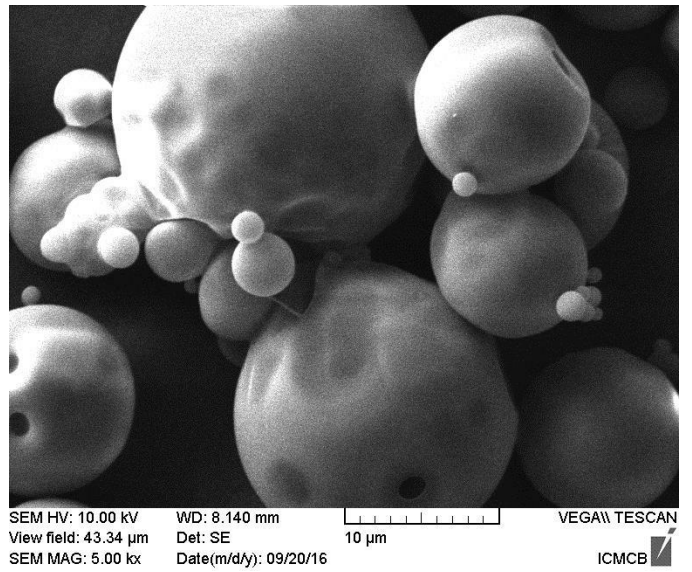
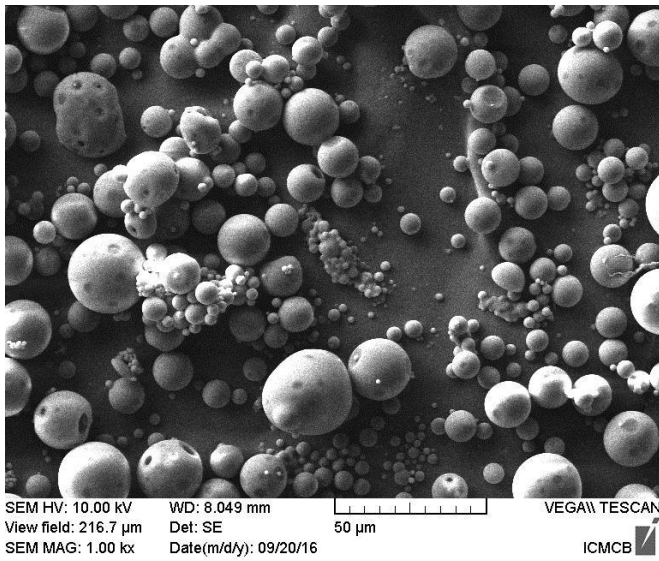
⇒ D160239



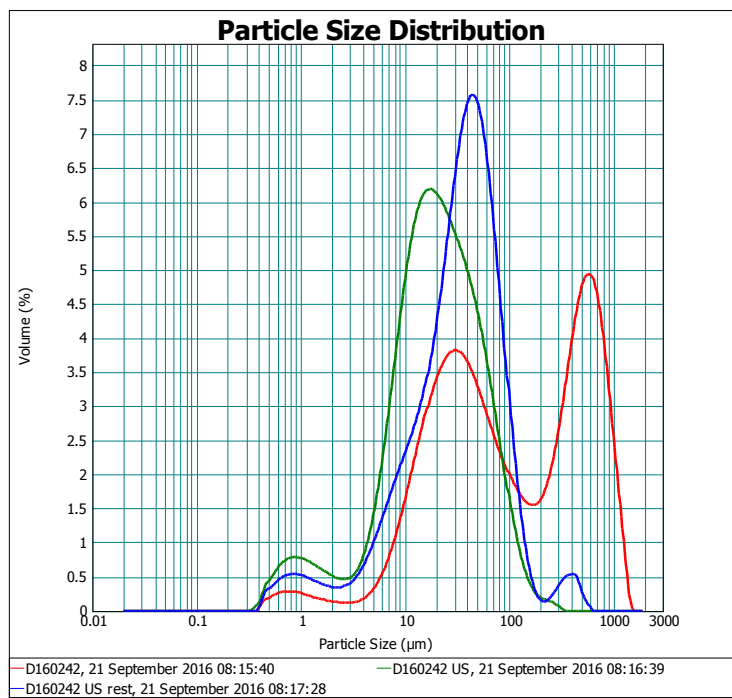
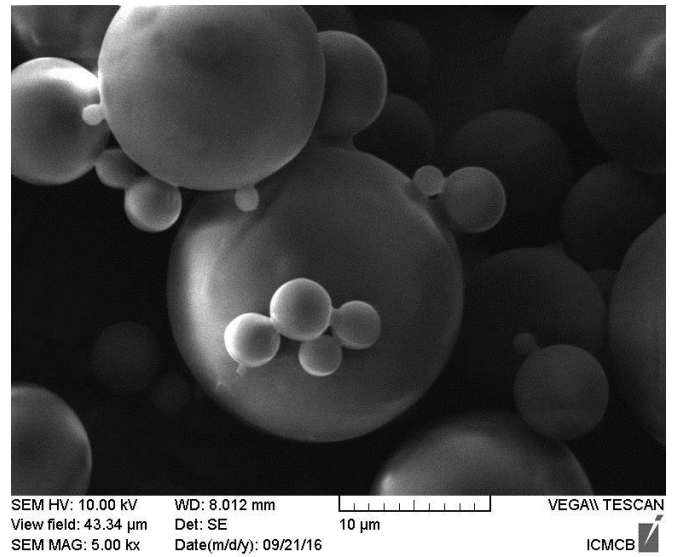
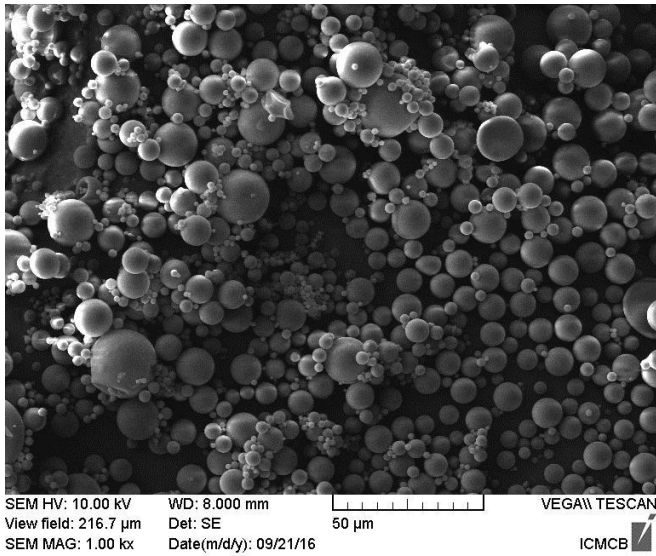
⇒ D160240



⇒ D160241



⇒ D160242



Record number	Sample Name		d (0.1)	d (0.5)	d (0.9)	Obscuration
5483	projet 007598/D160201	8.926	37.481	604.088	10.08	
5484	projet 007598/D160201 US		4.954	19.164	51.992	13.03
5485	projet 007598/D160201 US rest	6.437	28.574	65.272	11.06	
5486	projet 007598/D160204	3.378	15.676	72.004	8.01	
5487	projet 007598/D160204 US		3.040	14.615	43.820	7.88
5488	projet 007598/D160204 US rest	2.970	14.428	45.114	7.50	
5489	projet 007598/D160206	2.723	16.683	79.907	10.42	
5490	projet 007598/D160206 US		2.670	15.004	48.620	10.38
5491	projet 007598/D160206 US rest	3.079	15.491	45.267	10.18	
5492	projet 007598/D160207	5.967	31.676	141.954	5.04	
5493	projet 007598/D160207 US		4.006	26.836	145.468	5.04
5494	projet 007598/D160207 US rest	3.964	25.974	142.050	4.91	
5495	projet 007598/D160208	2.601	13.292	220.991	10.27	
5496	projet 007598/D160208 US		1.679	9.350	159.308	10.78
5497	projet 007598/D160208 US rest	1.646	9.171	158.120	10.71	
5498	projet 007598/D160209	6.630	27.350	77.180	5.13	
5499	projet 007598/D160209 US		4.560	21.591	44.805	5.60
5500	projet 007598/D160209 US rest	4.571	21.792	48.962	5.47	
5507	D160210		11.064	43.693	407.826	6.39
5508	D160210 US		6.228	21.010	54.281	8.49
5509	D160210 US rest	9.002	40.934	80.553	6.13	
5510	D160211		3.525	16.462	42.007	6.04
5511	D160211 US		3.476	14.938	32.766	7.21
5512	D160211 US rest	3.438	14.715	31.722	7.17	
5513	D160232		7.590	33.117	99.921	5.71
5514	D160232 US		5.067	26.930	88.254	6.41
5515	D160232 US rest	4.984	26.503	88.114	6.35	
5517	D160234		12.789	68.059	216.320	10.46
5518	D160234 US		1.738	9.511	71.579	10.64
5519	D160234 US rest	1.728	9.552	81.446	10.44	
5520	D160235		11.948	66.662	240.605	7.21
5521	D160235 US		8.261	50.663	207.083	7.14
5522	D160235 US rest	8.016	48.925	219.587	6.84	
5523	D160236		9.921	26.016	163.663	6.99
5524	D160236 US		3.609	17.105	41.954	9.14
5525	D160236 US rest	3.234	15.788	31.046	8.95	
5532	D160237		7.173	18.276	38.154	8.61
5533	D160237 US		5.629	16.881	32.893	9.18
5534	D160237 US rest	5.566	16.837	32.499	9.01	
5535	D160238		5.975	29.094	101.176	8.72
5536	D160238 US		5.744	23.014	74.801	8.41
5537	D160238 US rest	5.647	22.977	72.296	8.12	
5538	D160239		11.801	29.168	80.981	3.78
5539	D160239 US		8.151	19.680	40.857	5.02
5540	D160239 US rest	7.821	18.852	34.458	5.09	
5541	D160240		84.476	237.900	557.369	4.05
5542	D160240 US		20.478	81.699	198.633	14.02
5543	D160240 US rest	39.711	104.959	229.589	11.97	
5544	D160241		12.455	35.617	529.586	4.31
5545	D160241 US		8.098	18.779	35.947	5.14
5546	D160241 US rest	8.918	20.790	40.481	4.92	
5547	D160242		12.936	86.905	752.785	7.72
5548	D160242 US		4.806	20.047	67.637	15.93
5549	D160242 US rest	6.860	35.751	91.377	12.97	

N° lot	Observations des courbes granulométriques
D160201	Observation de 2 pics majeurs Les ultrasons permettent de décaler la courbe vers la gauche et d'abolir le 2 ^{ème} pic ⇒ Présence d'agréats Légère tendance à la réagglomération après les ultrasons (courbe décalée vers la droite)
D160204	Les 3 courbes se superposent quasiment. Légère présence d'agréats : 2 ^{ème} et 3 ^{ème} pic de faible intensité qui sont légèrement réduits après les ultrasons
D160206	Les 3 courbes se superposent quasiment. Légère présence d'agréats : 2 ^{ème} pic de faible intensité légèrement réduits après les ultrasons
D160207	Les 3 courbes se superposent quasiment. Observation de 2 pics de même hauteur. Quasiment aucun impact des ultrasons sur la granulométrie ⇒ 2 populations de tailles de microsphères
D160208	Observation de 2 pics majeurs. Les ultrasons permet de réduire l'intensité du 2 ^{ème} pic ⇒ Les ultrasons n'ont pas permis de détruire totalement les agrégats
D160209	Les 3 courbes se superposent quasiment. Légère présence d'agréats : 2 ^{ème} pic de faible intensité qui disparaît lors de les ultrasons mais réapparaît ensuite
D160210	Observation de 2 pics majeurs. Les ultrasons permet de décaler la courbe vers la gauche et d'abolir le 2 ^{ème} pic ⇒ Présence d'agréats Tendance à la réagglomération après les ultrasons (courbe décalée vers la droite)
D160211	Les 3 courbes se superposent quasiment. Légère présence d'agréats : 2 ^{ème} pic de faible intensité abolit après les ultrasons
D160232	Les 3 courbes se superposent quasiment. Observation de 2 pics majeurs rapprochés. Quasiment aucun impact de les ultrasons sur la granulométrie ⇒ 2 populations de tailles de microsphères
D160234	Les ultrasons permet de décaler significativement la courbe vers la gauche mais avec apparition d'un 2 ^{ème} pic de faible intensité ⇒ Les ultrasons n'ont pas permis de détruire totalement les agrégats
D160235	Les 3 courbes se superposent quasiment. Observation de 2 pics majeurs rapprochés. Quasiment aucun impact de les ultrasons sur la granulométrie ⇒ 2 populations de tailles de microsphères
D160236	Avant les ultrasons, observation de 2 pics Les ultrasons permet d'abolir le 2 ^{ème} pic et de décaler légèrement la courbe vers la gauche. Le 2 ^{ème} pic réapparaît au repos après les ultrasons
D160237	Les 3 courbes se superposent quasiment. Légère présence d'agréats : 2 ^{ème} pic de faible intensité qui disparaît lors de les ultrasons
D160238	Les 3 courbes se superposent quasiment. Observation de 2 pics majeurs rapprochés et d'un 3 ^{ème} pic de plus faible intensité. Les ultrasons permettent d'abolir le 3 ^{ème} pic ⇒ 2 populations de taille de microsphères + présence d'agréats
D160239	Observation de 2 pics dont un de faible intensité Les ultrasons permet de décaler la courbe vers la gauche et d'abolir le 2 ^{ème} pic ⇒ Présence d'agréats Tendance à la réagglomération après les ultrasons (réapparition du 2 ^{ème} pic sur la gauche)
D160240	Observation d'un seul pic. La courbe est décalée vers la gauche durant les ultrasons mais s'aplatit au repos après
D160241	Observation de 2 pics majeurs Les ultrasons permet d'abolir le 2 ^{ème} pic ⇒ Présence d'agréats
D160242	Observation de 2 pics majeurs Les ultrasons permet d'abolir le 2 ^{ème} pic. La courbe s'aplatit au repos après les ultrasons ⇒ Présence d'agréats