

République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان  
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM  
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers  
Département de BIOLOGIE



## MÉMOIRE

Réalisé par

**KHELIL Sidi Mohamed Mokhtar**

Et

**SOMAA Selsabil**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

En

**Biologie Moléculaire et Cellulaire**

Dans le cadre de l'article 1275 PME

**Thème :**

**LA BIOPRODUCTION DES PROTEINES THERAPEUTIQUES  
EN ALGERIE :  
APPLICATION MEDICALES STARTUP**

Soutenu le 19-06-2023, devant le jury composé de :

Président	SARI Lamia	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrant	DALI-YOUCHEF-SAHI Majda	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice	BENMANSOUR Meriem	M.C.B	Université de Tlemcen
Examinatrice	TEFIANI Choukri	M.C.B	Université de Tlemcen
Invite d'honneur	BERADIA Amina	Doctorante	Université de Tlemcen

**Année universitaire 2022/2023**

**العنوان:** الإنتاج الحيوي للبروتينات العلاجية في الجزائر: التطبيقات الطبية لبدء التشغيل  
**المخلص:**

إن إنتاج البروتينات العلاجية بواسطة التقنيات الحيوية يُعدّ وجهة جديدة في صناعة الأدوية، حيث يعتمد هذا النهج على استخدام الكائنات الحية لإنتاج المواد الفعّالة الطبية كبديل للإنتاج التقليدي الكيميائي. هذا الجانب من العلاجات الحيوية يحظى بمكانة ملفتة على الساحة العالمية، ويكتسب أهمية كبيرة في الأسواق الكبرى ذات الاقتصادات القوية مثل الولايات المتحدة ودول الاتحاد الأوروبي.

نظرًا للتطورات الملحوظة في مجال الصناعة الدوائية في الجزائر، تعمل وزارة الصناعة الدوائية على تنفيذ استراتيجيات تهدف إلى تعزيز الاقتصاد الوطني وتحقيق الاكتفاء الذاتي من خلال تقليل حجم الواردات وتشجيع الإنتاج المحلي من قبل شركات الصناعة الدوائية والشركات في مجال التكنولوجيا الحيوية. تشير النتائج التي تم الحصول عليها في عام 2021 إلى أن الجزائر قد نجحت في تحقيق تغطية تزيد عن 70% من الأدوية المنتجة محلياً، لكن في الواقع، الأدوية الكيميائية ما زالت تشكل جزءاً كبيراً من هذا الإنتاج. لذا، من أجل توسيع حصة السوق المتبقية، يجب أن نسعى لإنتاج هذا الجيل الجديد من الأدوية البيولوجية، وبالأخص تلك التي تحتوي على بروتينات **الكلمات المفتاحية:** الصناعة الحيوية، الأدوية الحيوية، سوق الصيدلة، بروتينات العلاجية المؤتلفة

**Titre:** La bioproduction des protéines thérapeutiques en Algérie: application médical startup

**Le résumé:**

La bioproduction de protéines thérapeutiques est une nouvelle approche prometteuse dans l'industrie pharmaceutique, remplaçant la production chimique par l'utilisation d'organismes vivants pour fabriquer des ingrédients actifs médicaux. Cette sous-branche des biothérapies a gagné une position significative sur le marché dans des économies avancées telles que les États-Unis et les pays de l'Union européenne.

En Algérie, le secteur pharmaceutique a connu des évolutions notables, incitant le ministère de l'industrie pharmaceutique à élaborer des stratégies visant à réduire les importations et à promouvoir la production locale par les laboratoires pharmaceutiques et les entreprises de biotechnologie. L'objectif est de diminuer la dépendance vis-à-vis des devises étrangères et de stimuler l'économie nationale. En 2021, l'Algérie a réussi à atteindre une couverture de plus de 70% en médicaments produits localement, principalement des médicaments génériques. Pour élargir la part restante du marché, il est essentiel de s'engager dans la production de cette nouvelle génération de médicaments, en mettant l'accent sur les protéines thérapeutiques

**Les mots clés:** Bioproduction, protéines thérapeutiques recombinant, Biomédicaments, Marché pharmaceutique.

**Title:** The bioproduction of therapeutic proteins in Algeria: Startup medical applications.

**Abstract:**

The bioproduction of therapeutic proteins represents a novel avenue in medical manufacturing, involving the utilization of living organisms to generate active components, as an alternative to chemically synthesized ones. This particular facet of biotherapies holds a significant position in the markets of economically strong countries, such as the United States and the European Union.

In light of the advancements within Algeria's pharmaceutical sector, the Ministry of Pharmaceutical Industry is actively formulating strategies to achieve self-sufficiency by curbing imports and promoting domestic products from pharmaceutical laboratories and biotech firms. This endeavor aims to reduce the demand for foreign currency and enhance the prosperity of the national economy.

The results obtained in 2021 reveal that Algeria has successfully achieved a coverage of over 70% for locally produced medications. However, this production predominantly comprises generic drugs. Therefore, to facilitate the expansion of the remaining segment of the market, a commitment to the production of this new generation of pharmaceuticals, particularly therapeutic proteins, is now imperative.

**Key words:** Bioproduction, Therapeutic proteins recombine, Biomedicines, Pharmaceutical market.

## **Liste des figures:**

<b>Figure1 :</b> Processus de recherche et développement dans l'industrie biopharmaceutique.....	1
<b>Figure2:</b> subdivision des bio-médicaments .....	9

## **Liste des tableaux:**

<b>Tableau 1</b> : les avantages et les inconvénients de systèmes d'expression .....	7
<b>Tableau 2</b> : Différents vecteurs de type ADN.....	8
<b>Tableau 3</b> : les biosimilaire commercialisées au cours des trois dernières années en Algérie.....	10

## **LISTE DES ABREVIATIONS :**

**ADN:** Acide Désoxyribose Nucléique  
**ADNc:** ADN complémentaire  
**ARN :** Acide Ribo Nucléique  
**ARNm:** ARN messenger  
**ARN pol:** ARN polymérase  
**ARNt:** ARN transport  
**AJI :** Arthrite Juvénile Idiopathique  
**BAC:** Bacterial Artificial Chromosome  
**Bs:** Biosimilaire  
**CCR:** Cancer Colo-Rectal  
**CHO:** Chinese Hamster Ovary  
**DMLA :** Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age  
**EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor  
**EPO:** Erythropoietin  
**FDA:** Food and Drug Administration  
**G-CS:** Facteur de Stimulation des Colonies de Granulocytes  
**GRAS:** Generally Regarded As Safe  
**IQVIA:** Powering Healthcare with Connected Intelligence  
**IRC :** Insuffisance Rénale Chronique  
**LLC :** Leucémie Lymphoïde Chronique  
**LNH:** Lymphome Non Hodgkinien  
**MPT:** Modification Post Traductionnel  
**OGM:** Organisme Génétiquement Modifié  
**PCR:** Polymerisation Chain Reaction  
**PR :** Polyarthrite Rhumatoïde  
**PtR :** Protéine Recombinante  
**PtRIT :** Protéine Recombinante d'Intérêt Thérapeutique  
**PtI :** Protéine d'Intérêt  
**RANKL:** Receptor Activator of Nuclear Factor- kB ligand.  
**Ré :** médicament Référence  
**RCH:** Rectocolite Hémorragique  
**SVF:** Sérum de veau fœtal  
**VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor  
**YAC:** Yeast Artificial Chromosome

## **TABLE DES MATIERES :**

1- Introduction .....	1
2- Aspects historiques de la production des protéines .....	1
3- Le contexte biopharmaceutique mondial .....	2
4- La bioproduction des protéines thérapeutiques recombinants .....	2
5- Le principe du génie génétique .....	3
A. Isolement d'un fragment d'ADN d'intérêt .....	3
B. Les différents systèmes d'expression .....	3
I. Le system bactérienne.....	4
II. Les levures et champignons .....	4
III. Les cellules d'insectes .....	4
IV. Les cellules de mammifères .....	4
V. Les animaux transgénique .....	5
VI. Les plantes transgéniques.....	5
VII. Le système Acellulaire .....	6
C. Les vecteurs d'expression .....	8
D. La purification .....	9
6- Les protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique .....	9
7- Le marché des Biomédicaments .....	10
8- Conclusion .....	12
9- Les références .....	12
10- Annexe .....	15

## 1- Introduction :

Les médicaments biologiques sont des avancées récentes en biotechnologie qui ont révolutionné la fabrication pharmaceutique en exploitant l'ingénierie du vivant. Ils se distinguent par leur capacité à cibler des cellules spécifiques, réduisant ainsi les effets secondaires par rapport aux médicaments chimiques classiques.

Lors de ces dernières années, ces types de médicaments ont commencé à se démarquer et à occuper un rang important sur le marché mondial, les grands laboratoires pharmaceutiques mondiaux connaissent une énorme tendance vers cette branche de fabrication. En Algérie, ces médicaments ont contribué à une augmentation significative des importations pharmaceutiques, ce qui peut avoir un impact négatif sur l'économie nationale étant donné l'importance et la rentabilité du secteur pharmaceutique dans l'économie globale du pays. Donc la question qui se pose est de savoir comment développer ce secteur émergent sur le marché pharmaceutique algérien tout en préservant la prospérité économique de l'État?

## 2- Aspects historiques de la production des protéines :

À l'origine, l'obtention primaire des protéines thérapeutiques était à partir de sources naturelles (sang, placenta et extraits de tissus d'origine animale), avec une limitation en quantité et un danger potentiel de contamination virale (J. Dumas and B. Robert, 2009). Cependant, à partir des années 70, des avancées dans le domaine du génie génétique a permis d'acquérir la première protéine thérapeutique issue de l'ADN recombinant produit à partir d'une souche atténuée de la bactérie « *Escherichia coli* » fabriquée par le laboratoire Lilly et approuvée par la FDA en 1982 et été commercialisé aux Etats-Unis, il s'agit de l'insuline recombinante humaine sous le nom commercial Humalog®.

La recherche et le développement de nouveaux médicaments est un processus complexe et chronophage. La première étape consiste à l'identification de la cible, la dernière se résume à l'approbation du médicament par les autorités réglementaires, la procédure s'étant jusqu'à 10 ans (figure 1).

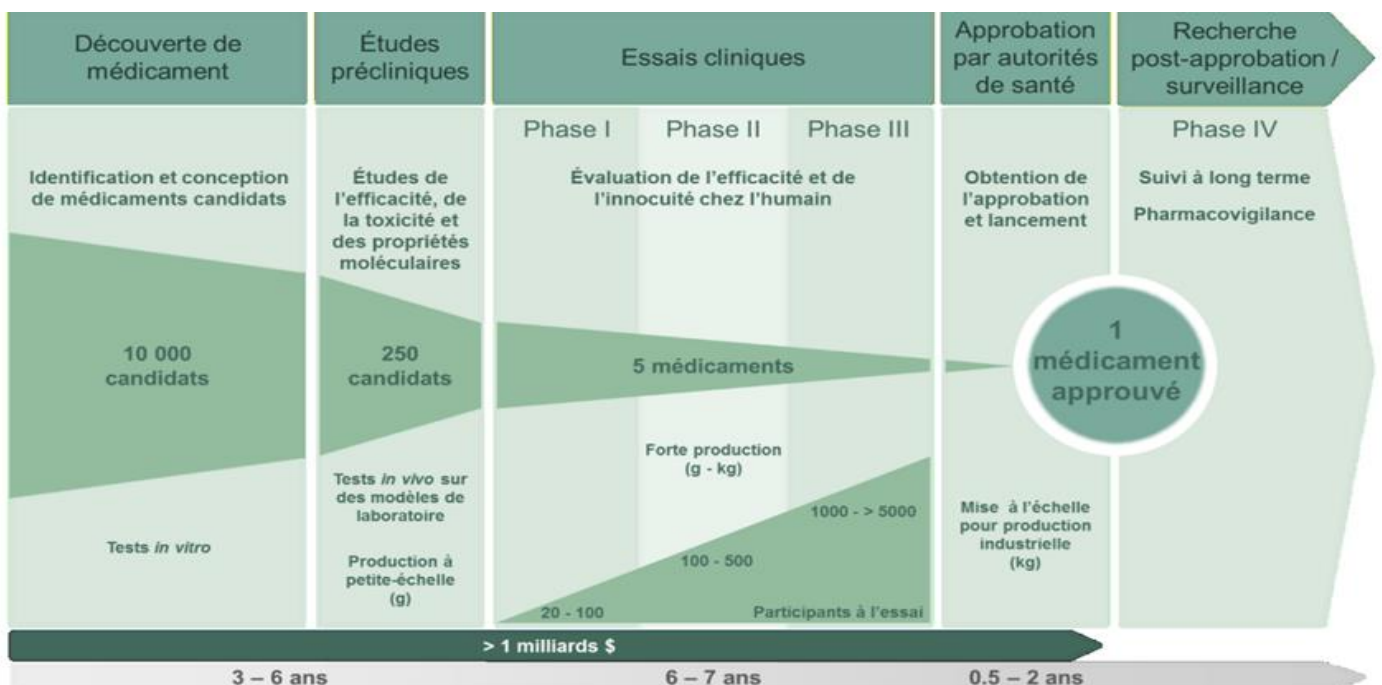


Figure (1) : Processus de recherche et développement dans l'industrie biopharmaceutique.  
(Le parcours du médicament, 2013)

Afin d'accélérer ce processus, l'industrie biopharmaceutique a investi considérablement dans l'optimisation du développement de lignées cellulaires, la mise au point de milieux de culture, ainsi que dans la mise en place de techniques de contrôle qualité pour surveiller la production de manière continue tout au long du processus. Actuellement, la FDA a approuvé plus de 120 protéines thérapeutiques, presque toutes issues de l'ADN recombinant, et plus d'une centaine est en phase préclinique (L. Fan et al., 2017 ; J. A. DiMasi, H. G. Grabowski et R. W. Hansen, 2016).

### **3- Le contexte biopharmaceutique mondial :**

Les médicaments biologiques sont désormais incontournables pour traiter de nombreuses maladies graves et invalidantes. Cependant, leur processus de production est plus complexe et coûteux que celui des médicaments chimiques, ce qui se reflète généralement dans leurs prix plus élevés. Par conséquent, la gestion de leur utilisation représente un défi important pour les systèmes de santé, à titre d'exemple, le coût annuel moyen d'un traitement d'une maladie inflammatoire de l'intestin avec un produit biologique aux États-Unis en 2015 a été estimé à environ 36 000 \$ USD (H. Yu et al., 2018).

Ces dernières années, les entreprises biopharmaceutiques ont intensifié leurs efforts pour développer des biosimilaires qui correspondent à des versions identiques de molécules déjà approuvées et qui possèdent la même séquence d'acide aminé, cette tendance est due en grande partie à l'expiration imminente ou déjà en cours des brevets de plusieurs médicaments biologiques majeurs. Mais l'utilisation de clones et de processus de production et de purification différents peut entraîner des microvariations qui peuvent affecter la qualité du produit final. Cependant, les agences de régulation exigent donc que les différences avec le produit de référence au niveau de la qualité, de la sûreté, de la pureté et de l'efficacité ne soient pas significatives (E. Olech et al., 2016). Par ailleurs, la forte augmentation des investissements dans ce développement offrira un accès plus abordable aux traitements pour les patients, cela grâce aux prix nettement plus compétitive que ceux des médicaments de référence (environ 30 à 50 % de moins) tout en stimulant la concurrence (G. Scaife et al., 2018).

Les produits biologiques sont pour la plupart des protéines recombinantes et parmi les plus notables on peut citer les anticorps monoclonaux, les vaccins, les enzymes, les hormones, les facteurs de croissance ou encore certains types de cytokines. Ils offrent des perspectives thérapeutiques à fort potentiel pour des besoins médicaux non satisfaits.

### **4- La bioproduction des protéines thérapeutiques recombinant :**

C'est un procédé de fabrication de médicaments biologiques qui appliquent différentes techniques d'expression de gène, ainsi produire la protéine souhaitée à partir des cellules vivantes génétiquement modifiées, pour traiter diverses maladies comme le cancer, le diabète, les maladies auto-immunes et les troubles génétiques.

Il existe deux catégories de production des protéines thérapeutiques, on compte l'industrielle où le contrôle des conditions de culture, la purification et la sécurité des protéines sont cruciaux pour une production efficace et rentable pour engendrer une quantité à grande échelle. Quant à l'artisanale, la quantité des protéines est limitée, pour cause, le manque d'équipements et d'infrastructures utilisés dans le cadre expérimental, universitaire ou des essais cliniques préliminaires. Mais peut être avantageuse pour les populations à faible revenu dans les pays en développement, car elle peut offrir un accès abordable et local aux protéines thérapeutiques pour répondre aux besoins (Duigou, A. 2010).



## 5- Le principe du génie génétique :

« Le principe du génie génétique repose sur le transfert d'un gène étranger dans des cellules en culture ou dans le tissu (somatique ou germinale) d'un animal ou d'une plante de façon à obtenir la manifestation d'une nouvelle propriété liée au gène ainsi transféré » (GROS, 1986)

La base de la bioproduction de protéine recombinante d'intérêt thérapeutique ou autrement appelée protéine hétérologue d'intérêt thérapeutique nécessite essentiellement un système biotechnologique de production adapté, qui repose essentiellement sur :

- a. Le gène qui code pour la PtI.
- b. La cellule hôte utilisée pour exécuter les instructions du gène inséré, afin de produire la protéine souhaitée.
- c. Un vecteur, l'élément génétique clé pour le transport.
- d. Le processus de séparation et extraction de la protéine du milieu de culture.

### A. Isolement d'un fragment d'ADN d'intérêt :

L'obtention des brins d'ADNc codant pour une PtI, on commence par l'extraction des ARNm totaux des cellules qui produisent cette protéine. Ensuite, on utilise l'enzyme transcriptase inverse pour la rétrotranscription de ces ARNm en ADNc monocaténaire, qui sera ensuite amplifié par PCR.

### B. Les différents systèmes d'expression :

L'hôte idéal doit exécuter correctement les instructions fournies par le gène étranger ce qui permet d'obtenir une protéine fonctionnelle et identique à la protéine naturelle. De plus, il doit être facile à utiliser et bien caractérisé, capable de prendre en charge l'insertion du transgène, de résister aux contraintes de culture cellulaire ou de fermentation à grande échelle et a un rendement suffisant pour répondre aux besoins.

Il existe une grande variété des systèmes couples vecteurs-hôtes, le choix d'un système par rapport à un autre dépendra principalement de caractéristiques et l'application du produit fini et des moyens disponibles.

Ci-dessous quelques exemples non exhaustifs des systèmes d'expression les plus couramment utilisés :

#### I. Le système bactérienne :

Ce système inclut des différentes espèces procaryotiques, le choix d'une espèce appropriées est dépendant de leurs avantages offerts et des caractères de PtI, tels que l'absence des endotoxines pour les bactéries Gram positif, l'existence des opérons régulateurs pour la transcription, le degré de pathogénicité, ...ect. Par exemple, la présence de promoteurs forts et des systèmes de sécrétion protéique bien développés chez les *Bacillus Subtilis* (Harwood, C. R. et Cranenburgh, R. 2008), la solubilité de protéines chez *Ralstonia eutropha* (Srinivasan S., Barnard G.C. et Gerngross T.U. 2002) en revanche, *Escherichia coli* est considérée l'un des hôtes les plus populaires pour la production de PtR. Elle a été très étudiée depuis les années 60, si bien qu'elle est la mieux connue aux niveaux biochimique, génétique et biologie moléculaire. Son exploitation a permis l'expression de grande quantité de protéines, pouvant atteindre jusqu'à 80% de leur poids sec (Demain and Vaishnav, 2009).

En effet, malgré le côté négative de cette bactérie qui est représenté par la faible capacité sécrétoire (Sandkvist et Bagdasarian, 1996), l'accumulation de PtR dans le cytoplasme ou le périplasme, sous formes d'agrégats insolubles appelés corps d'inclusions (Panda, 2003) et l'obligation des étapes successives de purification (où ses endotoxines doivent être éliminées) et de renaturation susceptible (García-Fruitós, E. et al., 2009), mais

elle reste une des options fréquemment utilisées à cause de ses propriétés intéressantes: croissance rapide avec un temps de dédoublement expéditif d'environ 20 min dans des milieux peu coûteux et simples.

## II. Les levures et champignons:

C'est un système qui recueille les espèces eucaryotique inférieures, la plupart sont considérés comme des organismes GRAS c'est-à-dire ni pyrogène ni pathogène. Ils offrent de nombreux avantages : capacité de prolifération rapide dans des milieux de culture simple et peu coûteux. Ils contiennent des promoteurs contrôlables et un taux de rendement généralement voisin à 100 milligrammes par litre (Cereghino and Cregg, 2000), la capacité de sécrétion des protéines hétérologues de petits poids moléculaires (polypeptides) mais les résultats sont moins probants pour les protéines de masse moléculaire élevée (Eckart et Bussineau 1996). Aussi parmi ses inconvénients elles sont capables de réaliser les MPTs mais les profils de N/O-glycosylation produits ne sont pas identiques à ceux retrouvés chez l'humain, ils sont caractérisés par une haute teneur en mannose (high-mannose) c'est-à-dire constitués d'une cinquantaine à une centaine de résidus de celui-ci. Cette hypermannosylation déclenche une réaction immunitaire néfaste chez l'humain (Gemmill, R. et Trimble, B.1999).

## III. Les cellules d'insectes :

Les trois principales lignées cellulaires d'insectes utilisées sont les Sf9 et Sf21 (issues du papillon *Spodopterafrugiperda*) et la lignée Hi5 (issue du papillon *Trichoplusia ni*). Ce système est basé sur le remplacement d'un gène viral de *baculovirus* par un gène d'intérêt qui va être contrôlé par le promoteur fort de polyhédrine. Il constitue une alternative intéressante par la taille du transgène intégré illimitée et l'expression simultanée de plusieurs gènes (Demain and Vaishnav, 2009), grâce aux vecteurs comportant jusqu'à trois promoteurs (deux P10 et un polyédrine) qui sont actuellement disponibles. A ce jour aucun virus de vertébrés ou prion n'a été identifié comme nuisible. Ce qui en fait un système sûr pour l'organisme humain, Quant au *baculovirus* il ne peut accomplir sa multiplication que dans les cellules d'insectes.

Par ailleurs, comparées aux bactéries ou aux levures le niveau d'expression est important, il peut représenter 30% des protéines cellulaires totales, avec des rendements plutôt élevés (d'environ 500 mg/L de  $\beta$ -galactosidase ont été obtenus dans des cellules Sf9) (A. W. Caron, J. Archambault, et B. Massie,1990). Cette méthode est capable d'obtenir des glycoprotéines avec des N-glycosylations similaires à celles des cellules de mammifère, mais il en résulte des MPTs imparfaites (mauvais repliement, hypo ou hyper-glycosylations, l'absence d'acide sialique ...ect) (Demain et Vaishnav, 2009), ce qui affecte la pharmacocinétique et l'efficacité clinique de PtRIT synthétisée.

## IV. Les cellules de mammifères :

Ce système est utilisé depuis près d'un quart de siècle pour la production de vaccins, et de protéines thérapeutiques et diagnostiques. L'expression est réalisée par plusieurs lignées cellulaires, parmi elles : des cellules de hamster (ovariennes : CHO, rénales : BHK), des cellules murines (myélomateuses : Sp2/0, plasmocytomateuses : NSO), des cellules humaines (embryonnaires rénales ou fibroblastiques : HEK ou MRC5, rétiniennes : PER.C6, cervicales : HeLa, lymphocytaires T : Jurkat), ...etc (Demain et Vaishnav, 2009 ; Dumas et Robert, 2009 ; Wurm, 2004). Le marché des PtR par cette méthode représente 60 à 70% des protéines thérapeutiques disponibles (Wurm, 2004 ; Jayapal et al., 2007), et dépasse aujourd'hui 20 milliards de dollars annuels (Griffin et al., 2007).

Les cellules de mammifères sont caractérisées par une croissance relativement lente (le temps de dédoublement d'environ 20h en comparaison à 20min chez *E.coli*) et une exigence en éléments nutritifs,

spécificité de la culture, elles sont délicates et coûteuses à cause de leur conditionnement en bioréacteurs nécessaire pour certaines (risque potentiel de déplétion en oxygène, d'accumulation de métabolites toxiques (lactate, ammonium,...) ce qui altère la qualité du produit et provoque l'apoptose cellulaire qui diminue la quantité) (Palomares et al., 2004, la difficulté de séparation de PtI des nombreuses protéines contenues dans le milieu enrichi en SVF (Palomares et al., 2004) et la présence de risque de contamination par des virus ou des prions (Demain et Vaishnav, 2009). Mais elles permettent d'obtenir des protéines complexes de grandes tailles avec des MPTs similaires à celles produites chez l'humain (N- et O-glycosylations, formation de ponts disulfures, etc...), essentielles pour leur stabilité et leurs fonctions biologiques, la présence d'un système de sécrétion efficace (au lieu de lyse cellulaire) en fait un outil rigoureux pour la production industrielle (J. Zhu, 2012).

#### V. Les animaux transgéniques :

La majorité des animaux transgéniques utilisés sont des mammifères, mais n'exclut pas l'existence de quelques expériences sur les espèces aviaires (Dumas et Robert, 2009). Il existe différentes techniques de transgénèse applicables (tel que la micro-injection de gène dans un des pronoyaux des embryons, transfert de noyaux contenant le gène intérêt dans des ovocytes anucléés, infection par des vecteurs lentiviraux, fécondation des spermatozoïdes préalablement incubés avec l'ADN à transférer, formation de chimères à l'aide de cellules souches embryonnaires portant le transgène...etc (Houdebine, 2009). L'espèce animale convenable est choisie selon la durée de son cycle reproductif, moins il est long plus il est en adéquation avec les exigences du développement pharmaceutique.

La qualité des protéines fournies par ce système est démontrée par les MPTs et les glycosylations très complexes qui sont proches à la synthétisation humaine (Houdebine, 2009) ce qui assure une production PtI fonctionnelle, comme le cas de métalloprotéine superoxydedismutase humaine produite sous forme active et tétramérique, normalement glycosylée et associée à l'ion cuivre par la lapine transgénique (Stromqvist et al., 1997). Mais ce processus est parfois incomplet, par exemple dans le cas des anticorps monoclonaux sécrétés dans le blanc d'œuf ne contiennent pas d'acide sialique (Zhu et al., 2005) ces modifications peuvent engendrer une diminution du temps de demi-vie de molécule et peuvent compliquer l'utilisation clinique. De surcroît, Ce système présente aussi des inconvénients tels que la transmission des agents pathogènes, la difficulté de la transgénèse sur les grandes corpulences, les problèmes éthiques comme les effets indésirables que peuvent avoir les PtR (Par exemple, le gène de l'hormone de croissance humaine associé au promoteur WAP (Whey Acidic Protein) de lapine, s'exprime en dehors de la glande mammaire ce qui peut perturber sa croissance et sa reproduction) (Devinoy et al., 1994). Ces enjeux engendrent aussi des coûts importants comme dans le but de respecter les conditions d'hébergement spécifiques.

#### VI. Les plantes transgéniques :

Ce système d'expression est basé sur deux procédures de transgénèse applicables pour les végétaux : le transfert direct du transgène par la technique de la biolistique ou alors l'infection spécifique par des virus le contenant (Demain et Vaishnav, 2009). Parmi les espèces végétales habituellement utilisées, figurent le tabac, la luzerne, le colza, le maïs, le riz et la pomme de terre. Récemment, la société PAT (Plant Advanced Technologies) basée à Vandoeuvre-lès-Nancy a mis au point la bioproduction de PtRIT par des plantes carnivores c'est le « PAT Vendredi® » (Biteau, 2008, brevet WO/2008/040599).

Parmi les inconvénients majeurs, la différence d'équipement enzymatique par rapport aux cellules de mammifères, il en résulte des profils de glycosylation incomplets (sans acide sialique ou l'ajout de résidus xylose) et immunogènes, ceux-ci les rendent fortement allergéniques pour l'Homme (Dumas et Robert, 2009)

et modifient le devenir et la biodistribution des PtRIT dans l'organisme (Saint-Jore-Dupas et al., 2007). La difficulté de purification de PtR produites réside dans l'élimination des polyphénols et des substances pro-inflammatoires ou immunogènes pour l'Homme (Houdebine, 2009). En outre, l'utilisation de plantes transgéniques soulève également des problèmes éthiques et environnementaux comme l'éventuelle dissémination des transgènes par le pollen. Plusieurs pistes sont étudiées pour y remédier : l'utilisation de plantes stériles, la culture en serre, l'expression transitoire des transgènes dans des plantes non génétiquement modifiées, ...etc (Dumas et Robert, 2009).

## VII. Le système Acellulaire :

Le système d'expression « cell free protein synthesis » est basé sur l'utilisation de la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle de la cellule pour produire une protéine spécifique à partir d'une information génétique particulière. En d'autres termes, la différence majeure entre ce système et les systèmes classiques in vivo est la capacité à contrôler ces mécanismes fondamentaux et les processus biochimiques de la transcription de l'ADN (ou l'ADNc) amplifiés par PCR en ARNm et traduction de celui-ci en polypeptides en dehors des cellules vivantes. On différencie les systèmes acellulaires selon 3 critères :

- L'origine de l'extraction cellulaire : s'il s'agit de cellules procaryotes ou eucaryotes (E. coli, germes de blé, réticulocytes de lapin...)
- Le type de systèmes : Systèmes traductionnels seuls, systèmes couplés (transcription et traduction réalisées en continuité dans le même milieu réactionnel, la majorité de cette catégorie appartient aux procaryotes), ou systèmes liés (transcription et traduction réalisées séparément, cette catégorie appartient aux eucaryotes car ces ARNm nécessitent une maturation post transcriptionnelle).
- La technique de production : Batch, CFCE, CECF, ...

L'utilisation de ce système demande au préalable une étude approfondie complète sur la protéine souhaitée, afin de déterminer la technique la plus adéquate. L'intérêt que peut avoir cette nouvelle méthode, réside dans la possibilité de modifier l'environnement de réaction de la protéine néosynthétisées de façon assez simple par l'ajout de réactifs, des enzymes, des facteurs requis pour exécuter des MPTs, des chaperonnes protéine-dépendant et catalyseurs selon les caractéristiques de protéine d'intérêt, afin d'améliorer leur repliement, ainsi assurer la fonctionnalité et l'activité biologique.

Cette technologie offre l'avantage de pouvoir la production des protéines notoirement difficiles à synthétiser (protéines toxiques pour la cellule hôte, protéines membranaires, complexes protéiques...) et se passe des étapes de clonage et de fermentation. Parmi les innovations on peut citer la capacité d'utilisation des ARNpol exogènes afin d'augmenter la formation d'ARNm, aussi l'introduction d'ARNt spécifiques de codons rares permet la synthèse de protéines particulières. D'un autre côté, Le procédé est onéreux, par la nécessité d'ajouter des réactifs en grand volume (nucléotides, sources d'énergie (Zawada et al., 2003).

Malgré l'évolution de la technique sur le plan du rendement et du coût de production ce système n'a jamais été utilisé à ce jour comme moyen de production pour des produits thérapeutiques commercialisés.

Pour récapitule les systèmes d'expression de PtR, le tableau (1) récapitule les principaux avantages et inconvénients de chaque système mentionné :

Systèmes d'expression	Avantages	Inconvénients	Type de protéines produites
Bactéries	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faibles coûts de production</li> <li>- Croissance rapide</li> <li>- Très bons rendements</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas de sécrétion</li> <li>- Pas de MPTs</li> <li>- Formation de corps d'inclusions</li> <li>- Présence des endotoxines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cytokines</li> <li>Enzymes</li> <li>Peptides</li> </ul>
Levures	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Croissance rapide</li> <li>- Faibles coûts de production</li> <li>- Protéines sécrétées</li> <li>- Absence de risques biologiques</li> <li>- Rendements importants</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Glycanes avec haute teneur en mannose</li> <li>-Ne produit pas toutes les MPTs humaines</li> <li>- Difficulté à sécréter des grosses molécules</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cytokines</li> <li>Enzymes</li> <li>Peptides</li> <li>Facteurs de la coagulation</li> <li>Vaccin humain</li> </ul>
Cellules d'insectes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Flexibilité de la taille de transgène</li> <li>- MPTs élaborées</li> <li>- Potentiel de sécrétion</li> <li>- rendements importants</li> <li>- Pas de risque biologique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Glycosylation parfois incorrecte (hypo ou hyper)</li> <li>-Parfois le PtR est mal repliées</li> <li>-Parfois problème d'isolement de la PtR</li> <li>-Présence de protéases</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vaccin vétérinaire</li> <li>Vaccin humain</li> </ul>
Cellules de mammifères (Non-humaines)	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Réalisation de MPTs complexes</li> <li>-Protéines sécrétées</li> <li>-Bonne caractérisation des PtR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Coûts de production élevés</li> <li>-Présence possible de glycanes immunogènes</li> <li>- Absence de certaines glycosidases et glycosyltransférases humaines</li> <li>-Difficultés à produire certaines MPTs humaines</li> <li>- Rendements faibles</li> <li>- Parfois problème d'isolement de la PtR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anticorps monoclonaux</li> <li>Cytokines</li> <li>Enzymes</li> <li>Facteurs de la coagulation</li> <li>Hormones</li> <li>Vaccin humain</li> </ul>
Cellules Humaines	<ul style="list-style-type: none"> <li>-MPTs Humaines</li> <li>-Protéines sécrétées</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Coûts de production élevés</li> <li>-Risque biologique</li> <li>-Rendements faibles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anticorps monoclonaux</li> <li>Cytokines</li> <li>Enzymes</li> <li>Facteurs de la coagulation</li> <li>Hormones</li> <li>Immunosuppresseur</li> <li>Vaccin humain</li> </ul>
Animaux transgéniques	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Coûts de production réduits</li> <li>-Bons rendements</li> <li>- réalisation de Glycosylation et MPTs complexes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-La difficulté de Transgénèse</li> <li>-Présence possible de glycanes immunogènes</li> <li>-Risques biologiques</li> <li>- problème éthique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anticorps monoclonaux</li> <li>Facteurs de la coagulation</li> <li>Enzymes</li> </ul>
Plantes transgéniques	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Coûts de production réduits</li> <li>-Bons rendements</li> <li>- réalisation de glycosylation et MPTs complexes</li> <li>-Absence de risques biologiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Problèmes de tolérance</li> <li>Glycanes immunogènes</li> <li>-Difficulté d'extraction et de purification</li> <li>-Problèmes éthique et environnementaux</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Taliglucerase alfa</li> </ul>

Système A cellulaire	-la production rapide -Bons rendements -Bonne caractérisation -pas de purification	- la synthèse d'ATP et d'élimination des déchets ne sont pas renouvelés. - l'efficacité est limitée dans le temps	Pas de PtRIT réalisé jusqu'à moment
----------------------	---	--	-------------------------------------

Tableau (1) : les avantages et les inconvénients de systèmes d'expression

### C. Les vecteurs d'expression:

Il existe plusieurs types des vecteurs de clonage, et les critères de choix reposent sur la taille du transgène et la cellule hôte dans laquelle il sera introduit :

Les vecteurs	Cellule hôte	Taille du transgène (kb)
Plasmides	Bactérie	0,5-10
Bactériophages	Bactérie	10 – 20
BAC (Bacterial Artificial Chromosome)	Bactérie	50-300
YAC (Yeast Artificial Chromosome)	Levure	100-2000
Virus (Adénovirus, rétrovirus, lentivirus, etc)	Cellule animale ou insecte	Variable

Tableau (2) : Différents vecteurs de type ADN.

Les éléments indispensables qui doivent être insérés dans un vecteur pour produire une PtR sont :

- **L'origine de réplication** : Le processus de réplication dépend de la nature de la PtI et l'origine de l'hôte exprimé. Si le produit du gène est toxique on utilise une origine de réplication qui donne peu de copies, dans le cas contraire, l'inverse se produit. Par ailleurs, le positionnement d'ORI contrôle l'inhibition ou la stimulation de l'expression, Par exemple, si on veut exprimer un gène à effet non toxique, l'expression sera simultanée à la croissance de la population bactérienne. La fourche de réplication doit progresser dans le même sens que la transcription du gène, ainsi elle ne gênera pas la réplication du plasmide. Dans le cas du gène à effet toxique, l'expression s'effectuera en phase stationnaire, où la fourche de réplication doit progresser en sens inverse de la transcription pour avorter toute transcription non désirée au moment de la phase exponentielle.
- **Le promoteur** : Les promoteurs proximaux (la boîte TATA box ou Pribnow box chez les procaryotes) et distaux (enhancers) consistent en des séquences qui interagissent avec les protéines impliquées dans la transcription. Cet élément a deux caractéristiques principales :
  - i. **La force du promoteur** : qui présente la durée de la liaison faite entre le promoteur et l'ARNpol pour réaliser le processus de transcription. Plus la durée est longue plus le nombre de copies d'ARNm est important. Parmi les techniques les plus réalisées pour augmenter la force des promoteurs chez E.coli : l'utilisation d'un promoteur spécifique d'une ARN polymérase qu'on surproduit dans la cellule comme le promoteur de la protéine 10 du phage T7 avec l'ARNpol T7 (Studier et Moffatt, 1986) car cette polymérase est très spécifique si bien qu'elle ne transcrit que le gène d'intérêt, elle est 5 fois plus rapide que les polymérases bactérienne, et est insensible aux inhibiteurs d'autres ARNpol bactériennes comme rifampicine, grâce à son utilisation de la plupart des ribonucléotides triphosphate de la cellule.

ii. L'inductibilité : c'est à dire le contrôle de travail de vecteur sous la surveillance des éléments spécifiques (soit indicateurs soit des inhibiteurs ou des répresseurs de l'ARN pol). Lorsque la protéine est très toxique pour la bactérie, l'expression de celle-ci en début de la culture est inhibée la croissance cellulaire. En utilisant un promoteur inductible, pour inhiber la production jusqu'à la phase stationnaire on induira l'expression.

- Les séquences responsables de la transcription et la traduction : tel que Les séquences responsables de l'arrêt de la transcription, les séquences responsables de l'arrêt de la traduction qui sont représentées par un codon stop, Les séquences d'adressage chez les hôtes eucaryotes pour la sécrétion, ... etc.

#### D. La purification :

La séparation des PtR des autre protéines propres de l'hôte est possible grâce à ses propriétés physicochimiques, l'une des principales techniques utilisées pour obtenir les PtR pures, est la chromatographie liquide en raison de la rapidité d'analyse, du pouvoir de résolution et de la reproductibilité apportée en plus d'une compatibilité avec une large gamme de détecteurs (Leblanc, Y. 2022), il existe différent types utilisés selon la variété de leur phases stationnaires (en fonction de la taille, la charge ionique, l'hydrophobicité, l'affinité et l'interaction avec un ligand ...etc.). Par ailleurs, La spectrométrie de masse (MS) est devenue un outil indispensable à la caractérisation des protéines en raison des informations de structure qu'elle peut apporter, telle que la masse moléculaire, la séquence en acides aminés, la stoechiométrie de complexes non covalents ou la conformation. Le couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse (LCMS) constitue donc un atout majeur pour l'étude structurale des protéines (Leblanc, Y. 2022).

#### 6- Les protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique :

Le domaine de l'industrie biologique est subdivisé en plusieurs sections, selon le principe de base de la production, la figure ci-dessous montre la méthode de division :

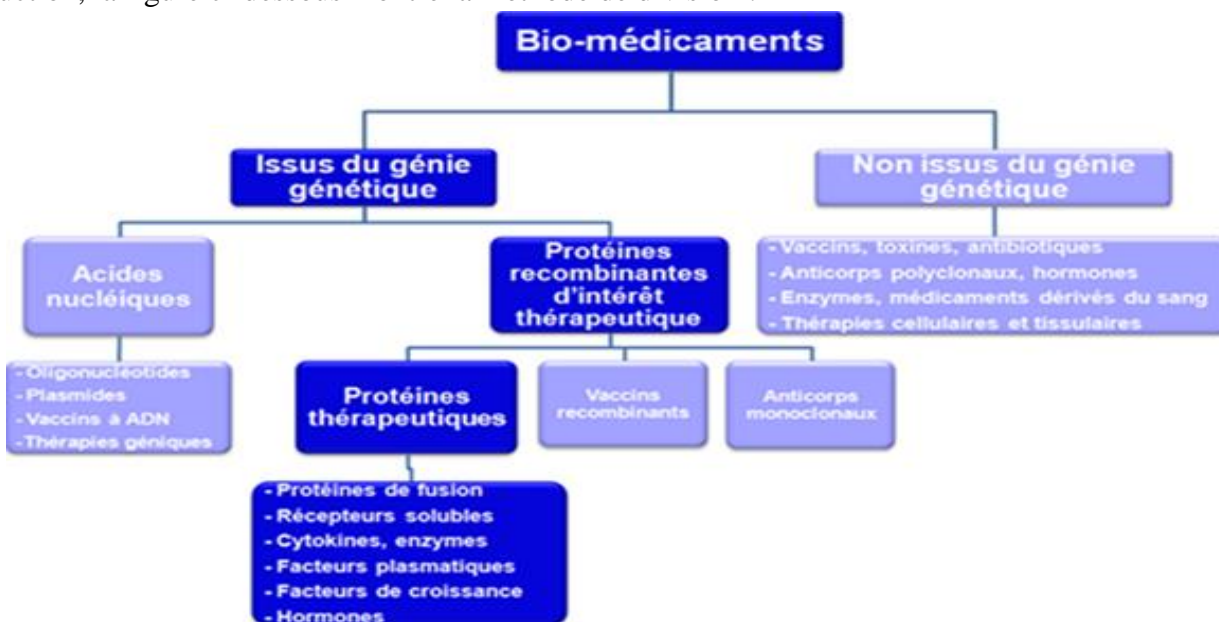


Figure (2) : subdivision des bio-médicaments.  
(Les entreprises du médicament, 2008)

Les bio-médicaments classés en trois catégories :

- Les médicaments de substitution : remplacent majoritairement les médicaments chimiques identique ou un traitement équivalent.

- Les traitements additifs : viennent s'ajouter aux thérapies existantes dans le traitement des cancers et des maladies cardiovasculaires.

- Les nouveaux traitements : produits traiter des affections qui il n'existait pas de médicaments.

## 7- Le marché des Biomédicaments :

À l'état mondial, selon le rapport de marché de Transparency Market Research, le marché mondial des protéines thérapeutiques recombinantes était estimé à environ 175 milliards de dollars américains en 2020 et devrait continuer à croître dans les années à venir (Recombinant Proteins Market 2020-2027). Les principaux acteurs du marché des PtR comprennent des grandes sociétés pharmaceutiques et biotechnologiques telles que Roche, Novartis, Amgen, Pfizer, Sanofi, Merck, GlaxoSmithKline, Biogen et AbbVie.

Concernant l'Algérie, Le premier biosimilaire fabriqué en Algérie est l'anticoagulant Varenox (DCI : enoxaparine) par les laboratoires Algérien frater-Razes qui inscrit dans le passage de l'ère chimique vers l'ère biologique pour suivre le développement industriel mondial (laboratoires frater-Razes). Mais malgré cela, le bilan annuel 2021 du comité économique des médicaments dit que par rapport la totalité des médicaments traités en Algérie 20% de ce produit sont importés étaient des biomédicaments. Dans les tableaux (3) figurent PtRIT commercialisées au cours des trois dernières années (2021-2023) en Algérie :

Nature dePtRIT	DCI Composition	Nom Commerciale	Classe pharmacologique	Domaine Thérapeutique (exemples d'indications)	Laboratoire exploitant	Le Pays	Type
AC monoclonaux	Ranibizumab	Lucentis®	Inhibiteur de la néo-vascularisation (anti-VEGF)	Ophthalmologie (DMLA)	Novartis Pharma Schweiz	Suisse	Ré
	Infliximab	Rémicade®	Immunosuppresseur (inhibiteur du TNF $\alpha$ )	Rhumatologie (polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante) Hépato-gastro-entérologie (maladie de Crohn, RCH) Dermatologie (psoriasis)	Janqgen Biologics	Pays bas	Ré
	Cetuximab	Erbix®	Immuno-modulateur (inhibiteur de l'EGFR)	Oncologie (carcinome épidermoïde de la tête et du cou, CCR)	Merck KgaA	Allemagne	Ré
	Dénosumab	Prolia® /Xgeva®	Inhibiteur de la résorption osseuse (inhibiteur de RANKL)	Oncologie (perte osseuse associée à un ttt hormono-ablatif chez les patients atteints d'un cancer de prostate) Rhumatologie (ostéoporose post ménopausique)	Amgen Europe B. V	Pays bas	Ré
	Panitumumab	Vectibix®	Immuno-modulateur (inhibiteur de l'EGFR)	Oncologie (cancer colorectal métastatique)	Amgen Europe B. V	Pays bas	Ré
	Rituximab	Mabthéra®	Immuno-modulateur (inhibiteur du CD20)	Onco-hématologie (LNH, LLC) Rhumatologie (PR)	Roche Pharma (Schweiz)	Suisse	Ré
	Tocilizumab	Actemra®	Immunosuppresseur (inhibiteur de l'IL-6R)	Rhumatologie (AJI)	Roche Pharma (Schweiz)	Suisse	Ré
	Trastuzumab	Herceptin®	Immuno-modulateur (inhibiteur de HER 2)	Oncologie (cancer du sein, cancer gastrique)	Roche Pharma (Schweiz)	Suisse	Ré
Canmab 150		Biocon Limited			Inde	Bs	



<b>Cytokine ou facteur de croissance</b>	Filgrastim	Neupogen®	Immunostimulants (Hormone de croissance G-CSF)	Oncologie (réduction des neutropénies post chimiothérapie cytotoxique)	Amgen Europe B. V	Pays bas	Ré
	Romiplostim	N plate®	Stimulant de L'hématopoïèse (facteur de croissance plaquettaire)	Hémostase (purpura thrombopénique auto-immunologique)	Amgen Europe B. V	Pays bas	Ré
	Interféron $\beta$ 1-A	Rebif®	Immunostimulant (interféron)	Neurologie (Sclérose en plaque)	Merck Senro Europe Limiyed	Royaume Uni	Ré
		Betaferon®			Bayer Schering Pharma Ag	Allemagne	Ré
Darbepoetine $\alpha$	Aranesp®	Stimulant de l'hématopoïèse (analogue de l'EPO)	Néphrologie et onco-hématologie (anémie du patient IRC ou sous chimiothérapie cytotoxique)	Amgen Europe B. V	Pays bas	Ré	
<b>Facteur de coagulation</b>	Octocog $\alpha$	Advate®	Facteur de la coagulation (facteur VIII)	Hémostase (hémorragies du patient HA)	Baxter Ag	Autriche	Ré
	Moroctocog $\alpha$	Refacto Af			Pfizer Limited	Royaume Uni	Bs
<b>Hormone</b>	Somatotropine	Saizen Clickeasy®	Hormone de croissance humaine	Endocrinologie (retards de croissance liés à Un déficit en hormone de croissance)	Merck Serono Spa	Italie	Ré
		Norditropine Nordiflex®			Novo Nordisk A/S	Danemark	Ré
		Omnitrope			Sandoz GmbH	Autriche	Bs
	Glucagon chlorhydrate	Glucagen Hypokit®	Hormone glycogénolytique	Métabolisme et nutrition (hypoglycémies sévères des patients insulino-traités)	Novo Nordisk A/S	Danemark	Ré
	Insuline Detemir	Levemir Flexpen®	Hormone hypoglycémisante (analogue de l'insuline) A action lente	Métabolisme et nutrition (diabète)	Novo Nordisk A/S	Danemark	Ré
	Insuline Glargine	Lantus®			Sanofi Aventis Deutschland GmbH	Allemagne	Ré
		Glarus			Spa/Biocare Biotech	Algérie	Bs
		Abasaglar			Eli Lilly Operations GMBH	Autriche	Bs
		Basalog One			BIOCON LIMITED	Inde	Bs
	Insuline Isophane	Insuman Basal®	Hormone hypoglycémisante (analogue de l'insuline) à action intermédiaire	Sanofi Aventis Deutschland/ Aventis pharma	Allemagne	Ré	
	Insuline Aspartate	Novomix 30 Flexpen®	Hormone hypoglycémisante (analogue de l'insuline) A action rapide	Novo Nordisk A/S	Danemark	Ré	
	Insuline Glulisine	Apidra®		Sanofi Aventis Deutschland	Allemagne	Ré	
Insuline Lispro	Humalog Mix25®	Eli Lilly Nederland B.V.		Pays Bas	Ré		

	Insuline	Insuman Rapid®			Aventis pharma	Allemagne	Ré
	Insuline Degludec	Tresiba Flextouch®	Hormone hypoglycémiant (analogue de l'insuline) A action ultra-longue		Novo Nordisk A/S	Danemark	Ré
<b>Divers</b>	Etanercept	Enbrel®	Immunosuppresseur (analogue du TNFR)	Rhumatologie (AJI) Dermatologie (Psoriasis)	Pfizer Limited	Royaume Uni	Ré
	Pegfilgrastim	Neulastim®	Immunostimulateur (analogue de G-CSF)	Oncologie (réduction des neutropénies post chimiothérapie cytotox)	Amgen Europe B. V	Pays Bas	Ré
	Epoetine $\alpha$	Epoetin Alfa Hxal	Hormone régulatrice de production érythrocytes	Oncologie (leucémie myéloïde aigue)	Hexal Ag	Allemagne	Bs

Tableau (3) : les biosimilaire commercialisées au cours des trois dernières années en Algérie.  
(NOMENCLATURE NATIONALE DES PRODUITS PHARMACEUTIQUES A USAGE DE LA MEDECINE HUMAINE)

Tel qu'approuvé par IQVIA en 2020, les principales aires thérapeutiques dans le marché mondial restent concentrées sur trois domaines : oncologie (14.4%), antidiabétique (9.5%) et immunologie (9.2%). Cependant, il diffère au niveau national les trois principales aires thérapeutiques sur le marché sont : antidiabétique (13.70%), antihypertenseurs (11.36%) et anti-infectieux bactérien (10.26%). Donc l'insuline est classée l'un de 10 principaux médicaments commercialisés en Algérie (coûte environ 44 milliards de dinars) (IQVIA).

Un saut qualitatif réalisé par l'unité de production Biothéra filiale du groupe des laboratoires Biocare Biotech qui fabrique le première médicament biologique « glarus » est une insuline Glargine biosimilaire de Lantus à origine 100% algérienne qu'actuellement commercialisée en 2023. Selon la déclaration de directeur Réda Kessal 38 produits médicale importés passés à la production locale durant l'année 2021, parmi ce produits 27 sont des anticorps monoclonaux biosimilaires utilisés dans le traitement de certains cancers et maladies rhumatismales et inflammatoires, ce qui permettre une baisse prévisionnelle de 105.26 millions dollars, mais en effet pour le moment ne sont pas commercialisée, elles sont en cours de validation ( ministère de l'industrie et de la production pharmaceutique).

## 8- Conclusion:

Les médicaments biologiques sont une partie intégrante du paysage pharmaceutique, ces médicaments sont particuliers du fait de la complexité de leurs conditions de production et d'exigences réglementaires, ils sont aujourd'hui un précieux levier pour maîtriser l'accès des patients aux traitements innovants et réaliser un développement économique national.

Malgré que le processus de la bioproduction est complexe et nécessite des investissements importants, notre objectif est de contribuer au développement d'un marché national compétitif de protéines thérapeutiques qui répond aux besoins internes, et peut atteindre une position maghrébine, africaine et mondiale.

## 9- Les références :

1. Dumas, J., & Robert, B. (2009). Bioproduction de protéines thérapeutiques-Revue et perspectives. *Médecine/sciences*, 25,18-26. <https://doi.org/10.1051/medsci/2009252s18>
2. S. L. Cancer. (2013), Le parcours du médicament. <http://www.synergielyoncancer.fr/les-enjeux/le-parcours-du-medicament>
3. Fan, L., Rizzi, G., Bierilo, K., Tian, J., Yee, J. C., Russell, R., & Das, T. K. (2017). Comparative study of therapeutic antibody candidates derived from mini-pool and clonal cell lines. *Biotechnology progress*, 33(6),1456-1462. <https://doi.org/10.1002/btpr.2477>
4. DiMasi, J. A., Grabowski, H. G., & Hansen, R. W. (2016). Innovation in the pharmaceutical industry: new estimates of R&D costs. *Journal of health economics*, 47,20-33. <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2016.01.012>
5. Yu, H., MacIsaac, D., Wong, J. J., Sellers, Z. M., Wren, A. A., Bensen, R., ... & Park, K. T. (2018). Market share and costs of biologic therapies for inflammatory bowel disease in the USA. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 47(3), 364-370. <https://doi.org/10.1111/apt.14430>
6. Ahmad, A. S., Olech, E., McClellan, J. E., & Kirchoff, C. F. (2016, April). Development of biosimilars. In *Seminars in arthritis and rheumatism* (Vol. 45, No. 5, pp. S11-S18). WB Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2016.01.002>
7. Nabhan, C., Parsad, S., Mato, A. R., & Feinberg, B. A. (2018). Biosimilars in oncology in the United States: a review. *JAMA oncology*, 4(2), 241-247. 10.1001/jamaoncol.2017.2004
8. Duigou, A. (2010). Maîtrise des procédés de culture cellulaire pour la production de vaccins (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré).
9. Harwood, C. R., & Cranenburgh, R. (2008). Bacillus protein secretion: an unfolding story. *Trends in microbiology*, 16(2), 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.001>
10. Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*, 27(3), 297-306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
11. Sandkvist, M., & Bagdasarian, M. (1996). Secretion of recombinant proteins by Gram-negative bacteria. *Current opinion in biotechnology*,7(5),505-511. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80053-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80053-X)
12. Panda, A. K. (2003). Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Biotechnology in India II*, 43-93. 10.1007/3-540-36466-8\_3
13. Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews*, 24(1), 45-66. <https://doi.org/10.1111/j.15746976.2000.tb00532.x>
14. Eckart, M. R., & Bussineau, C. M. (1996). Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Current opinion in biotechnology*,7(5),525-530. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80056-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80056-5)
15. Gemmill, T. R., & Trimble, R. B. (1999). Overview of N-and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*,1426(2),227-237. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(98\)00126-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00126-3)
16. Caron, A. W., Archambault, J., & Massie, B. (1990). High-level recombinant protein production in bioreactors using the baculovirus–insect cell expression system. *Biotechnology and bioengineering*,36(11),1133-1140. <https://doi.org/10.1002/bit.260361108>
17. Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology*, 22(11), 1393-1398.

18. Jayapal, K. P., Wlaschin, K. F., Hu, W. S., & Yap, M. G. (2007). Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chemical engineering progress*, 103(10), 40. Griffin, T. J., Seth, G., Xie, H., Bandhakavi, S., & Hu, W. S. (2007). Advancing mammalian cell culture engineering using genome-scale technologies. *Trends in biotechnology*, 25(9), 401-408. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.07.004>
19. Palomares, L. A., Estrada-Moncada, S., & Ramírez, O. T. (2004). Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Recombinant gene expression: reviews and protocols*, 15-51.
20. Zhu, J. (2012). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology advances*, 30(5), 1158-1170. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.022>
21. Houdebine, L. M. (2009). Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 32(2), 107-121. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.11.005>
22. Stromqvist, M., Houdebine, L. M., Andersson, J. O., Edlund, A., Johansson, T., Viglietta, C., ... & Hansson, L. (1997). Recombinant human extracellular superoxide dismutase produced in milk of transgenic rabbits. *Transgenic Research*, 6, 271-278.
23. Zhu, L., Van de Lavoie, M. C., Albanese, J., Beenhouwer, D. O., Cardarelli, P. M., Cuisin, S., ... & Etches, R. J. (2005). Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nature biotechnology*, 23(9), 1159-1169.
24. Devinoy, E., Thepot, D., Stinnakre, M. G., Fontaine, M. L., Grabowski, H., Puissant, C., ... & Houdebine, L. M. (1994). High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland. *Transgenic research*, 3(2), 79-89.
25. Biteau, F., Bourgaud, F., Gontier, E., & Fevre, J. P. (2012). U.S. Patent No. 8,178,749. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. brevet WO/2008/040599A1
26. Saint-Jore-Dupas, C., Faye, L., & Gomord, V. (2007). From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. *TRENDS in Biotechnology*, 25(7),317-323. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.04.008>
27. Zawada, J. F., Yin, G., Steiner, A. R., Yang, J., Naresh, A., Roy, S. M., ... & Murray, C. J. (2011). Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production—a new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnology and bioengineering*, 108(7),1570-1578. <https://doi.org/10.1002/bit.23103>
28. Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology*, 189(1), 113-130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
29. Leblanc, Y. (2022). Caractérisation de protéines thérapeutiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay).
30. Karengera, E. (2017). Amélioration de la production et de la qualité des protéines thérapeutiques recombinantes produites en culture en mode cuvée-alimentée de cellules de mammifère. Ecole Polytechnique, Montreal (Canada).
31. Lassale, C., Sibenaler, C., Béhier, J. M., Plétan, Y., & Courcier, S. (2008). La France, un pays attractif pour la recherche clinique internationale: enquête 2008 du Leem. *Therapies*, 63(5), 345-357. <https://doi.org/10.2515/therapie:2008061>
32. MarketsandMarkets, Recombinant Proteins Market 2020-2027.
33. Laboratoires frayer-Razes. (2020), Lancement d'un biosimilaire fabriqué en Algérie VARENOX. <https://frater-razes.com/frater-razes-lancement-dun-biosimilaire-fabrique-en-algerie-varenox/>
34. Ministère de l'industrie pharmaceutique, Nomenclature Nationale des Produits Pharmaceutiques à usage de la médecine humaine au (15-juin-2021; 31-aout-2022; 28 février 2023).

<https://www.industrie.gov.dz/>

35. IQVIA, <https://www.iqvia.com/>

36. 34. Ministère de l'industrie pharmaceutique, <https://www.miph.gov.dz/fr/>

## 10- Annexe :

# Business Model Canvas

1- **Propositions de Valeur** : La bioproduction local de l'Insuline humaine locale à partir de sources biologiques *E.coli* présente une valeur significative dans le marché Algérien car l'aire thérapeutique du diabète considère comme le segment le plus important, importation annuelle représente environ 52.86 million DZD. Cette approche offre plusieurs avantages, tout d'abord la production des biosimilaires est innovent en Algérie par rapport la production des génériques ce qui signifie moins de concurrents locaux, d'autre part, mènera a l'arrêt de l'importation de même produit ce qui fera le seul produit dans le marché et la coordination avec la Pharmacie Central des Hôpitaux (PCH) sera garanti a 100% tant qu'il n'y a pas de concurrents.

2- **Les clients ciblés**: ce produit ciblé principalement les laboratoires de biosimilaires en Algérie. Parmi eux : Frater Razès et Biocare Biotech. Ces laboratoires sont des acteurs importants dans la bioproduction de médicaments biosimilaires en Algérie.

3- **Relation avec Client** : L'objectif principal de notre projet c'est la couverture de besoin national en insuline Aspartate (à long terme), et pour établir des relations privilégiées avec notre client on propose des prix compétitifs par rapport au prix d'importation, fournir des promotions de vente et facilitation de transaction monétaire, par exemple, l'achat de deux quantités d'insuline à la fois permet de recevoir une troisième gratuitement ce qui encourage les clients à acheter en plus grande quantité et Pour les clients permanents, le prix de la quatrième charge toujours est réduit de moitié, ce qui récompense leur fidélité et leur engagement.

Ces stratégies commerciales visent à établir des relations solides avec les clients, tout en assurant un approvisionnement fiable.

4- **Type de vente**: la méthode de vente est principalement directe (B2 B). Cela signifie que les ventes de l'insuline se font directement auprès des laboratoires pharmaceutiques, ce canal permet d'établir des relations solides et directes avec les clients, facilitant la communication, la collaboration et la personnalisation des offres en fonction des besoins spécifiques de chaque client, tout en garantissant une relation étroite avec les clients pour répondre à leurs exigences et assurer leur satisfaction.

5- **Partenaires clés** : nous avons besoin des collaborations étroites avec plusieurs partenaires clés, notamment :

- L'institut Pasteur (France) : le fournisseur de souche *E.coli* (OGM).
- Groupe Word lab (Algérie) : Fournisseurs des appareils.
- ScienceLabo import (Algérie) : Fournisseurs de verrerie pratique laboratoire.
- Comptoir des flacons (France): Fournisseurs des flacons d'emballages.
- L'Agence du Médicament et des Produits de Santé (AMM) joue un rôle essentiel en tant qu'organisme de contrôle de la qualité.

#### 6- **Activités clés :**

Au début, la première activité c'est l'importation des matières premières (*E coli* OGM et leur milieu de culture). Ensuite, la production de l'insuline où nous fournir les conditions optimales aux bactéries pour obtenir le grand rendement possible, ses étapes sont : la fermentation, L'extraction de l'insuline produite et requalifier, La purification obtenir la forme pure de protéine.

Enfin, l'emballage en flacons et c'est prêt à être vendu aux les laboratoires pharmaceutiques.

#### 7- **Ressources clés :** Représenté dans :

- Matières biologiques :

La souche (*E. coli*) génétiquement modifié, Les milieux de cultures (TSB+Kanamycin monosulfate) et milieu de croissance bactérien dans le bioréacteur

- Matériels et appareils:

Les tube à essai, Flacons, Bioréacteur, Centrifugeuse, Homogeniseur, Dialysais membrane, Agitateur, Chromatographie d'affinité, Chromatographie en phase inverse, Autoclave, Incubateur, Refrigerator.

- Les produits :

Les Tampons, Dénaturant, Sodium sulphate, sodium sulfate decahydrate, glycine NaOH, B-mercaptoethanol, Enzymes de Cleavage, L'acétonitrile, TFA.

- Local de l'usine

- La main d'œuvre

#### 8- **La structure des coûts:** (tout est détaillé dans le tableau)

#### 9- **Flux de revenus :**

Selon le protocole de Md.Unuse Ali (Insulin and its industrial production by using fermentation technique, FLSB, SAU. 2016) que nous avons suivi, après le calcul de coûts totaux des outils éphémères qui est détaillés dans la partie précédente, nous sommes arrivés à revenu perçu est : 340 279,8 DZD pour 1.5g d'insuline a commencé partir 5g de *E.coli*.

Nous avons travaillé pour comparer notre prix avec les autres prix d'insuline importés (comme concurrent) mais malheureusement nous n'avons pas pu obtenir de cette information a cause des raisons de confidentialité des sociétés productrices.

En essaierons autant que possible de rendre nos prix raisonnables et adaptés au prix du marché, par la recherche constamment des autres moyennes et outils pour réduire et optimiser les coûts de production.

## 7 -Ressources clés :



### ▪ **Matières biologiques :**

- *E. coli* génétiquement modifié
- Les milieux de cultures:
  - TSB+Kanamycin monosulfate
  - Milieu de croissance bacterien

### ▪ **Matériels et appareils:**

- Tube à essai
- Flacons
- Bioréacteur
- Centrifugeuse
- Homogeniseur
- Dialysais membrane
- Agitateur
- Chromatographie d'affinité
- Chromatographie en phase inverse
- Autoclave
- Incubateur
- Refrigerator

### ▪ **Les produits :**

- Tampons
- Dénaturant
- Sodium sulphate
- sodium sulfate decahydrate
- glycine NaOH
- B-mercaptoethanol
- Enzymes de Cleavage
- L'acétonitrile
- TFA

### ▪ **Local de l'usine**

### ▪ **La main d'œuvre**

## 5- Partenaires clés:



- Les fournisseurs de matières premières : institut Pasteur, France
- Fournisseurs des appareils: Groupe World lab, Algérie
- Fournisseur de verrerie de production et de conditionnement: ScienceLa bo import, Algérie; Comptoir des flacons, France
- Organisation de control de qualités : Autorisation de Mise sur le Marché (AMM)

## 6-Activités clés :



- ✓ Importation de matières premières.
- ✓ La production de l'insuline Aspartate
- ✓ Purification et formulation
- ✓ Conditionnement et contrôle
- ✓ Conservation
- ✓ La vente

## 3-Relation avec les clients



- ✓ Couverture de besoin national en insuline Aspartate (à long terme)
- ✓ Un prix compétitif par rapport aux prix d'importation.
- ✓ Les offres proposées:
  - Promotion de vente
  - Facilitation de transaction monétaire

## 4- Type de vente



- La vente direct (B2B) D'usine aux laboratoire pharmaceutique.

## 1-Propositions de Valeur

La production local de l'Insuline Aspartate à nature biologique par *E.coli*.

## 2- les clients ciblés



- Les laboratoires des Biosimilaires en Algérie:
  - Biocare biotech (Biothéra)
  - Frater Razes



## 8-La structure des coûts



### 1- Les matières éphémères :

#### 1.1- La matière biologique:

- La souche bactérienne *E.coli* (OGM) : **45000 DZD**

#### 1.2- Les matières chimiques :

- Le milieu de culture bactérien :
  - TSB **24210 DZD/L**
  - Kanamycin monosulfate (ATB): **4080 DZD/5g**
  - Tampon:
    - Tris-HCL **13348DZD/500g**
    - dihydrogénophosphate de potassium **8152 DZD/1L**
- Les produits chimiques nécessaire pour la production
  - Dénaturant (GdmHCL) : **31790 DZD/500g**
  - Sodium sulphate et sodium sulfate decahydrate: **11271 DZD/kg**
  - glycine NaOH: **4679.61DZD/500 ml**
  - B-mercaptoethanol: **4062.56DZD/250ml**
  - Enzymes de Cleavage:
    - Trypsin: **17067DZD/ 50mg**
    - Carboxypeptidase B: **60246 DZD / 25mg**
  - Acetonitrile: **12530 DZD/2.5L**
  - Trifluoroacetic: **6491DZD/ 100g**
- Les verreries :
  - Tube à essai 200 ml : **2486 DZD/unité**
  - Flacons100ml : **73200 DZD/100 unité**

### 2- Local et appareillage de travail :

- ❖ Local de l'usine: **350000 DZD/ mois**
- ❖ Bioréacteur (BioNet Reactor): **340 787 DZD/ unité**
- ❖ Centrifugeuse (Avanti J-HC): **51986 DZD/ unité**
- ❖ Homogénéiseur 45000 PSI : **219544 DZD/ unité**
- ❖ Dialysais membrane (Spectra/ por 6-8000 MWCO) : **731200 DZD/ unité**
- ❖ Agitateur (magnétique chauffant Guardian 5000, OHAUS) : **84088 DZD/ unité**
- ❖ Chromatographie : **380,145 DZD/unité**
  - D'affinité : **3174138 DZD/ unité**
  - En phase inverse **7505148 DZD/ unité**
- ❖ Autoclave (Advance Pro, PRESTIGE MEDICAL): **6127456 DZD/unité**
- ❖ Incubateur : **2193600 DZD/ unité**
- ❖ Réfrigérateur : **350829 DZD/unité**

## 9-Flux de revenus



Selon le protocole de Md.Unuse Ali (Insulin and its industrial production by using fermentation technique, FLSB, SAU. 2016) que nous avons suivi, après le calcul de couts totaux des outils éphémères qui est détaillés dans la partie précédente, nous sommes arrivés à revenu perçu est : **340 279,8 DZD** pour 1.5g d'insuline a commencè partir 5g de *E.coli*.

---