

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenu publiquement le 21 Novembre 2014
Par Melle Pauline DULOARD**

FABRICATION DU VACCIN CONTRE LA GRIPPE SAISONNIERE

Membres du jury :

Président : (GAYOT, Anne, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Lille)

Assesseur(s) : (MUSCHERT, Susanne, Maître de conférences, Faculté de Pharmacie, Lille)

Membre(s) extérieur(s) : (BECHU, Thomas, Responsable conditionnement Sanofi Le Trait)

(GILLIER, Aurélien, Coordinateur projets Travaux Neufs Sanofi Le Trait)



Université Lille 2
Droit et Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises
dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.96.40.40 - ☎ : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université Lille 2
Droit et Santé

Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice-présidents :	Professeur Alain DUROCHER Professeur Régis BORDET Professeur Eric KERCKHOVE Professeur Eric BOULANGER Professeur Frédéric LOBEZ Professeur Damien CUNY Professeur Benoit DEPREZ Professeur Murielle GARCIN Monsieur Pierre RAVAUX Monsieur Larbi AIT-HENNANI Monsieur Antoine HENRY
Directeur Général des Services :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Luc DUBREUIL
Vice-Doyen, 1 ^{er} assesseur :	Professeur Damien CUNY
Assesseurs :	Mme Nadine ROGER Professeur Philippe CHAVATTE
Chef des services administratifs :	Monsieur Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2

M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie

Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire (80%)
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
Mme	HOUSSIN-THUILLIER	Pascale	Hématologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie

Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DROUET	Maryline	Pharmacie Galénique
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique

REMERCIEMENTS

Après six années d'études de Pharmacie passées à Lille, je peux clôturer mon parcours par cette thèse d'exercice inspirée de mon stage de fin d'étude.

Je tiens à remercier en premier lieu mes parents. Vous m'avez soutenue et encouragée pendant ces 6 années d'études. C'est grâce à vous que j'ai gardé confiance en moi dans les moments plus durs, et c'est avec vous que j'ai partagé mes moments d'épanouissement et de fierté dans mon travail. Merci.

Il me semble évident de remercier l'ensemble de mes professeurs qui nous ont transmis leur savoir et souvent leur passion pour leur matière.

C'est un remerciement tout particulier que j'adresse à Madame le professeur Anne Gayot qui m'a suivie et guidée tout au long de mon parcours en étude de pharmacie. C'est grâce à vous que j'ai choisi la voie de l'Industrie Pharmaceutique. C'est dans cette voie que je m'épanouis et que j'aspire à de beaux projets de carrière. Tout a commencé pendant les cours et les TP de galénique qui étaient mes préférés !

Je remercie également ma famille et notamment mes sœurs et ma marraine pour avoir cru en moi et pour m'avoir toujours supportée en période d'examens.

J'exprime un remerciement particulier à mon compagnon Maxime qui m'aura soutenue et supportée au quotidien ces dernières années et qui m'aura suivie dans mes choix de carrière.

Je tiens à adresser de sincères remerciements à mes différents maîtres de stage (Hugues Hérion, Islam Bentabet et Thomas Bechu) pour leur confiance et pour m'avoir permis d'acquérir différentes connaissances au sein des industries Pharmaceutique et cosmétique. Ils m'auront donné le goût et l'envie de continuer dans cette voie.

D'autre part, je garderai beaucoup de bons souvenirs de mon passage à la faculté de Pharmacie de Lille. J'ai rencontré des personnes avec qui j'ai noué des liens d'amitié et avec qui j'espère garder contact. Charlotte, Mika, Max, Agathe, Mimi, Eloïse, Céline, Geogeo...j'ai passé de très bons moments avec vous bien que ce fût parfois des moments douloureux (révisions, projets, examens...). Merci à vous !!

Enfin, j'adresse mes remerciements à toute l'équipe du conditionnement de chez Sanofi Le Trait (Cindy, F-X, Xavier, Arnaud) ainsi qu'à Aurélien Gillier pour m'avoir offert mon premier emploi au service projet Travaux neufs.

REMERCIEMENTS

INTRODUCTION :

I. PREPARATION ET MISE EN PLACE DE LA CAMPAGNE DE FABRICATION

I.1 DESCRIPTION DU VIRUS

I.1.1 Généralités sur le virus de la grippe

I.1.2 Composition des virus

I.1.3 Mécanisme de réplication du virus

I.2 DETERMINATION DES SOUCHES A PARTIR DES DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

I.2.1 Rôle de l'OMS

I.2.2 Validation du choix de la souche par l'EMA

I.2.3 Mise à disposition des souches par le NIBSC

I.3 DEPOT REGLEMENTAIRE DU VACCIN CONTRE LA GRIPPE SAISONNIERE

I.3.1 Généralités

I.3.2 Modifications du dossier d'AMM pour changement de souche

I.3.3 Rôle de l'ANSM

II. LE VACCIN CONTRE LA GRIPPE ET SA PREPARATION

II.1 ROLE DU VACCIN

II.1.1 Généralités

II.1.2 Les différents types de vaccins contre la grippe saisonnière

II.1.3 Mécanisme du vaccin contre la grippe

II.2 FORMULATION DES VACCINS

II.2.1 La voie d'administration

II.2.2 La composition de la suspension de vaccin

II.2.3 Le vaccin contre la grippe : préparation aseptique

II.3 PREPARATION ET CONTROLE DES SOUCHES

II.3.1 Mise en culture des souches

II.3.2 Traitement des souches récoltées pour obtention des monovalents

II.3.3 Validation de la suspension vrac

III. FABRICATION DU VACCIN EN SERINGUES PRE-REMPLES

III.1 PREPARATION DE L'ENVIRONNEMENT DE TRAVAIL

III.1.1 Généralités sur les conditions de fabrication

III.1.2 Préparation des conditions de travail : milieu, main d'œuvre, méthodes et matière

III.1.3 Préparation du matériel

III.2 REMPLISSAGE

- III.2.a Définition du remplissage aseptique
- III.2.b Les étapes du remplissage aseptique
- III.2.3 Les contrôles effectués au remplissage
- III.3 MIRAGE
 - III.3.a Définition du mirage
 - III.3.b Les étapes du mirage
 - III.3.c Les contrôles effectués au mirage
- IV. CONDITIONNEMENT ET DISTRIBUTION DU VACCIN
 - IV.1 ETAPES DE CONDITIONNEMENT
 - IV.1.1 Définition du conditionnement
 - IV.1.2 Les étapes du conditionnement
 - IV.1.3 Les contrôles effectués au conditionnement
 - IV.2 CONDITIONS DE TEMPERATURE DU VACCIN
 - IV.3 LIBERATION PHARMACEUTIQUE
- V. INNOVATION ET AVENIR
 - V.1 INNOVATIONS SUR LA FORMULATION :
2 SOUCHES B
 - V.2 INNOVATION SUR LA FORME DU VACCIN : INJECTION INTRADERMIQUE
ET INTRANASALE
 - V.3 INNOVATION SUR LE CONDITIONNEMENT
- CONCLUSION
- LISTE DES FIGURES UTILISEES
- LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS
- BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION :

La **grippe** (ou *influenza*) est une maladie infectieuse fréquente et contagieuse causée par trois virus à ARN de la famille des *Orthomyxoviridae* (*Myxovirus influenzae* A, B et C), touchant les oiseaux et certains mammifères dont le porc, le phoque, et l'être humain¹. Qu'elle soit saisonnière ou pandémique elle fait de nombreuses victimes. 2 à 7 millions de personnes par an sont touchées par la grippe saisonnière en France. Il est impossible de recenser le nombre de victimes des gripes pandémiques car cela dépend des pays, des années et surtout de la virulence de la pandémie.

La grippe peut sembler être une maladie anodine mais l'épidémie saisonnière est responsable de 250 000 à 500 000 décès par an dans le monde. (En France environ 350 morts par an).²

Les traitements sont généralement symptomatiques, cependant, il existe des traitements qui permettent de prévenir la propagation de la grippe chez l'homme. En effet, le vaccin contre la grippe saisonnière est le traitement prophylactique de référence permettant de lutter contre l'épidémie saisonnière. Il existe des traitements antiviraux par voie orale : comprimés de l'oseltamivir (Tamiflu[®]) et le zanamivir (Relenza[®]). Les antiviraux utilisés par voie orale sont des médicaments utilisés pour la prévention et le traitement précoce de la grippe en réduisant la capacité du virus à se multiplier. Administrés le plus tôt possible après contact avec une source d'infection, ils préviennent la maladie.

Le travail effectué dans cette thèse consiste à expliquer les différentes étapes de fabrication du vaccin contre la grippe et son évolution depuis son développement dans les années 1930s.

De sa conception à son injection, le vaccin subit de nombreuses étapes et de nombreux contrôles. De la détermination des souches, en passant par la réalisation des cuves, le remplissage des seringues, le conditionnement et la distribution, chaque étape est tracée et enregistrée.

La fabrication du vaccin contre la grippe saisonnière se fait préférentiellement en seringue pré-remplie. Le conditionnement en flacon est plus généralement utilisé pour la fabrication du vaccin pandémique. Le procédé de fabrication est le même pour les deux types de vaccin. Le vaccin pandémique ne contient généralement qu'une souche de virus contrairement au vaccin contre la grippe saisonnière qui contient généralement trois souches de virus. Nous traiterons du remplissage des seringues pré-remplies car il est plus contraignant que celui en flacon.

I. PREPARATION ET MISE EN PLACE DE LA CAMPAGNE DE FABRICATION

I.1 DESCRIPTION DU VIRUS

I.1.1 Généralités sur le virus de la grippe

La grippe est une maladie infectieuse et contagieuse, due aux Myxovirus Influenzae A, B et C, évoluant sous la forme de grandes pandémies entrecoupées d'épidémies saisonnières localisées et dont la gravité varie en fonction de l'épidémiologie.

En ce qui concerne l'origine du virus, les réservoirs animaux joueraient un rôle important dans l'apparition de nouveaux variants chez l'homme. L'oiseau semblerait être l'hôte original des virus de la grippe et les virus grippaux aviaires constitueraient un gisement important de gènes viraux.

Le virus de la grippe appartient à la famille des Orthomyxoviridae. Ce sont des virus enveloppés à ARN simple brin de polarité négative. Ils ont une forme sphérique de 80 à 100nm de diamètre.

Même s'il est impossible de distinguer les virus A et B sur le plan clinique, on peut les différencier d'un point de vue génique car les virus de type A ont plusieurs sous-types sur la base de leurs antigènes de surface : l'hémagglutinine (H1 à H17 - les antigènes H16 et 17 ont été identifiés plus tardivement) et la neuraminidase (N1 à N9) tandis que les virus de type B ne possèdent que deux lignées connues : « Victoria » et « Yamagata ».

Les virus A et B sont à l'origine des épidémies saisonnières mais seul le virus A peut être responsable de pandémies³. Le virus C se limite à une expression sporadique et les symptômes sont proches d'un simple rhume.

I.1.2 Composition des virus

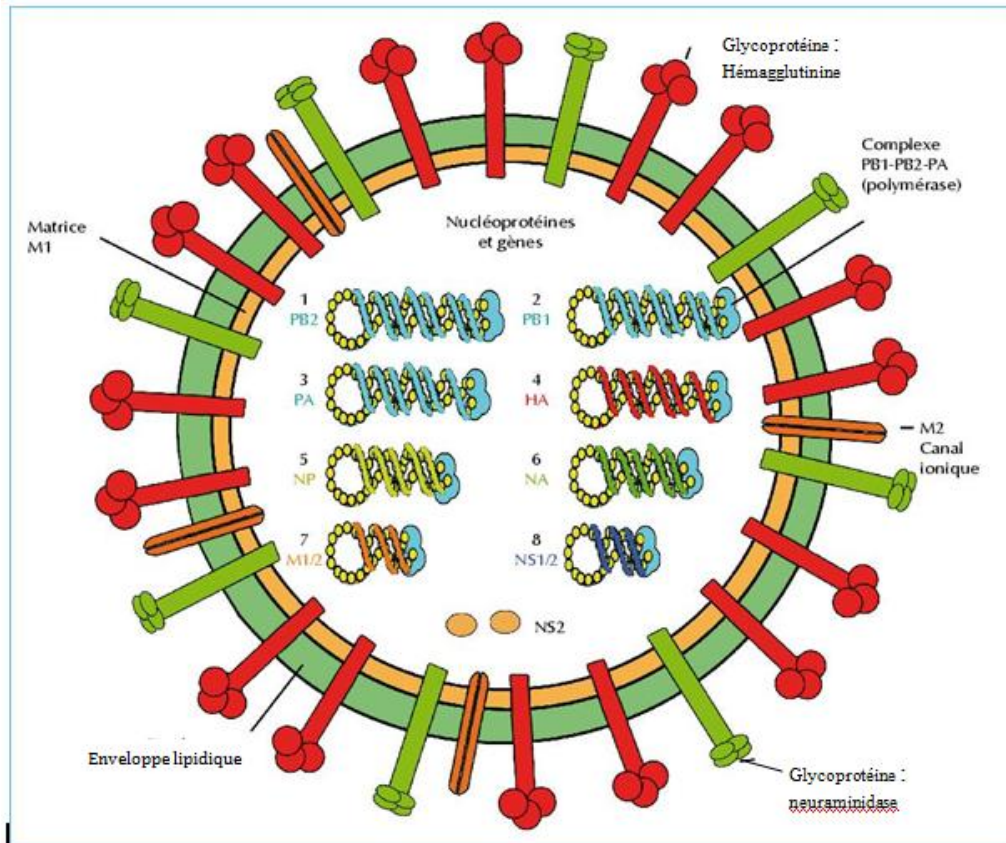


Figure 1: Structure schématique d'un virus Influenza A⁴

Les virus sont composés d'une enveloppe lipidique contenant des spicules à leurs surfaces formées par des glycoprotéines. Les virus A et B comportent deux types de glycoprotéines principaux : l'Hémagglutinine (H) et la Neuraminidase (N).

L'hémagglutinine (glycoprotéine) représente environ 40% des glycoprotéines de surface et est formée par deux sous-unités HA1 et HA2 reliées par un pont disulfure. L'hémagglutinine permet la fixation du virus sur l'acide sialique terminal des cellules de l'épithélium cilié de l'arbre respiratoire : elle est très immunogène induisant la production d'anticorps dont certains peuvent être neutralisants. Elle favorise aussi la fusion des membranes virales et cellulaires au cours de la phase de pénétration du virus.

La neuraminidase (glycoprotéine: N-Acétyl-neuraminyl-hydrolase) est une sialidase présente sous la forme d'homotétramères à la surface de la particule virale. Elle permet la libération de virions néoformés. Elle lyse les acides sialiques présents à la surface de la cellule de l'épithélium cilié de l'arbre respiratoire, ce qui permet de détacher l'hémagglutinine de la particule virale néoformée de la cellule hôte.

Le virus C par contre, n'a qu'une sorte de spicule à la surface des particules virales qui assure donc les rôles de l'hémagglutinine et de la neuraminidase.

Le génome viral est fait d'ARN monocaténaire. Le génome des virus Influenza A et B est divisé en 8 segments distincts codant 10 ou 11 protéines. Le génome du virus C contient 7 segments codant 9 protéines. Il y a les gènes de l'hémagglutinine et de la neuraminidase (respectivement appelés **HA** et **NA** sur le schéma) qui codent pour l'hémagglutinine glycoprotéine et la neuraminidase glycoprotéine. Il existe une grande variabilité génique et donc antigénique de HA et NA pour les virus Influenza A ce qui n'existe pas pour le virus B.

Les gènes de la polymérase : **PB1**, **PB2** et **PA** codent 3 protéines qui forment un complexe trimérique constituant l'ARN polymérase de structure du virus. Un trimère est lié à l'extrémité de chacun des 8 segments du génome.

Le gène codant la nucléoprotéine est défini comme **NP** sur le schéma. Cette nucléoprotéine permet l'enroulement hélicoïdal des fragments d'ARN dans la particule virale formant ainsi les 8 ribonucléoprotéines.

Le gène **M** code pour les deux protéines de la matrice M1 et la matrice M2. La première constitue une couche protéique sous l'enveloppe du virus et la seconde forme le canal ionique de la particule virale grâce à sa configuration en tétramère.

Le gène **NS** code les protéines non structurales⁵.

I.1.3 Mécanisme de réplication du virus

Le cycle de réplication du virus comprend huit phases. Il est schématisé sur la figure ci dessous :

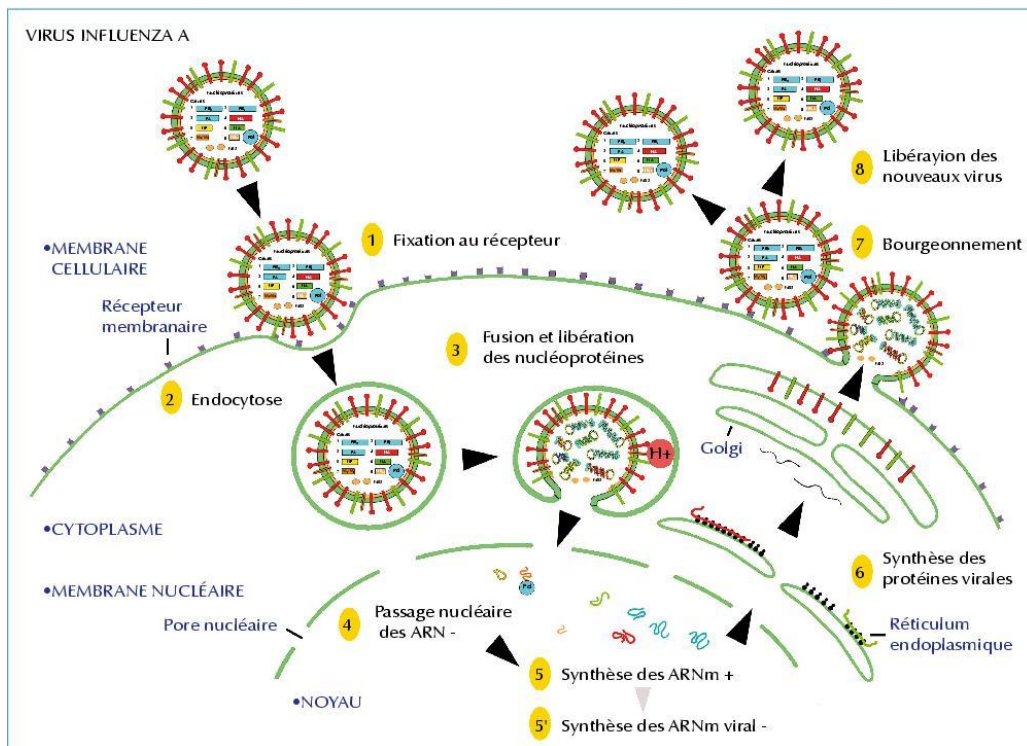


Figure 2: Cycle cellulaire de réplication du virus de la grippe.⁶

1) fixation au récepteur: la particule virale se fixe sur une cellule épithéliale respiratoire grâce à son récepteur, l'hémagglutinine, qui se lie à l'acide sialique terminal des glycoprotéines de membrane cellulaire.

2) endocytose: la particule virale est englobée au sein d'une vésicule d'endocytose.

3) fusion et libération des nucléoprotéines : L'hémagglutinine change alors sa conformation ce qui permet la fusion entre la membrane endosomale cellulaire et la bicouche lipidique virale. Les nucléoprotéines sont alors libérées dans le cytoplasme cellulaire. (Voir schéma)

4) passage nucléaire des ARN : une fois entré dans le noyau de la cellule hôte, le génome des virions grippaux sert de matrice à une ARN-polymérase. Chaque cellule infectée peut produire plusieurs centaines de virus.

5) synthèse des ARNm et ARNm viraux : l'ARN polymérase est l'enzyme responsable de la réplication et de la transcription de l'ARN viral. Elle copie ces molécules d'ARN en deux types d'ARN positifs : les premiers servent de matrice à la synthèse des brins négatifs constituant le génome viral et les deuxièmes constituent les ARN positifs messagers.

6) synthèse des protéines virales : le virus détourne le métabolisme cellulaire pour synthétiser ses propres protéines.

7) bourgeonnement : les virions néoformés se forment par bourgeonnement à la surface de la membrane cellulaire.

8) libération : libération des virions néoformés et dissémination dans l'épithélium respiratoire

I.2 DETERMINATION DES SOUCHES A PARTIR DES DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES⁷

I.2.1 Rôle de l'OMS

La composition du vaccin est réactualisée chaque année en fonction des données virologiques et en tenant compte du contexte épidémiologique. Ces données sont recueillies à travers le monde par des centres de référence nationaux (exemple en France : Institut National de Veille Sanitaire INVS). Elles sont ensuite collectées et capitalisées par les quatre centres de référence mondiaux de la grippe dépendants de l'OMS (organisation mondiale de la santé).

Les quatre centres de référence mondiaux sont :

- Center for Disease Control (CDC) situé à Atlanta aux Etats unis
- Center for Reference and Research on Influenza (CRRI) à Parkville en Australie
- National Institute of Health (NIH) à Tokyo au Japon
- National Institute for Medical Research (NIMR) à Londres en Europe

Ces quatre laboratoires permettent de faire la synthèse de tous les résultats d'isolement, de typage et sous-typage (phénotypages et génotypages) des souches qui ont circulé durant l'année en cours dans les deux hémisphères.

Le typage du virus permet de déterminer s'il s'agit d'un virus de type A, B ou C. Le sous-typage permet de déterminer exactement de quelle souche il s'agit. C'est-à-dire pour les virus de type A : quelle Hémagglutinine (H1 à H17) et quelle Neuraminidase (N1 à N9) sont présentes à la surface du virus et pour les virus de type B : quelle lignée est concernée (« victoria » ou « Yamagata »).

Afin de caractériser les souches, sont mises en oeuvre des techniques « classiques » de virologie utilisant du sérum de furet postinfection. Ces méthodes font appel à des épreuves d'inhibition de certaines propriétés des virus grippaux telles que l'hémagglutination et l'activité neuraminidasique.

Ces réactions d'inhibition permettent de vérifier que les souches circulantes sont antigéniquement apparentées aux souches déjà rencontrées à travers le monde les années précédentes, ou grâce aux réactions croisées, de définir un nouveau variant qui sera alors susceptible d'être proposé comme candidat vaccin de la nouvelle composition.

Aujourd'hui, il existe de nouvelles méthodes utilisant :

- Les anticorps monoclonaux, spécifiques d'épitopes de l'hémagglutinine ou de la neuraminidase, qui permettent d'affiner les études de caractérisation antigénique et fonctionnelle des virus grippaux.
- La biologie moléculaire, telle que le séquençage des gènes de l'hémagglutinine et de la neuraminidase virales qui permet de confirmer cette identité et définit l'appartenance phylogénétique de la souche.

Une fois ce recueil de données réalisé l'OMS détermine les souches à inclure dans le vaccin pour la saison grippale suivante :

-en février-mars pour l'hémisphère Nord

-en octobre pour l'hémisphère Sud, en sachant que pour les deux hémisphères le choix des souches est fait pour la saison grippale suivante

Tous les ans, à la mi-février, une réunion d'experts virologues appartenant aux différents centres de référence mondiaux de la grippe se tient au siège de l'OMS à Genève. C'est lors de cette réunion que l'ensemble des données épidémiologiques recueillies par les différents centres sont présentées.

L'identification antigénique des souches circulantes et l'étude des variations mineures ou majeures permettent de décider du maintien ou du changement des souches vaccinales dans la composition du vaccin prévu pour l'hiver suivant.

Donc, la recommandation des souches pour l'hémisphère Nord fait l'objet, en février, d'une publication dans le relevé épidémiologique hebdomadaire de l'OMS, notifié de la manière suivante : « *En conséquence, il est recommandé d'utiliser pour la saison 20XX/20XX des vaccins trivalents contenant les souches suivantes : une souche Ax, une souche Ay et une souche B* »

En ce qui concerne la souche B, la décision sera prise par les **autorités sanitaires nationales** sur la base des données épidémiologiques locales.

De même, en Septembre, l'OMS publie une seconde recommandation pour les souches de la composition vaccinale destinée à la zone australe.

I.2.2 Validation du choix de la souche par l'EMA

Un mois après la réunion de l'OMS, se tient à Londres une réunion d'experts permettant d'harmoniser au sein de l'Union Européenne les recommandations pour la composition du vaccin grippal. Cette réunion a lieu tous les ans depuis 1992 à l'Agence Européenne pour l'Evaluation des médicaments (EMA), avec les représentants des autorités nationales compétentes des différents états membres et sous la responsabilité du CHMP : *Committee for Medicinal Products for Human Use* (anciennement CSP : Comité des Spécialités Pharmaceutiques).

Un bilan de la campagne vaccinale précédente est effectué en exposant les résultats relevés par chacun des états membres. Sont abordés les sujets concernant la pharmacovigilance, les stabilités et l'immunogénicité des vaccins grippaux administrés l'année précédente.

Après ce bilan, un expert en biologie moléculaire du centre national de référence de la grippe à Londres et un virologue du NIBSC (National Institute for Biological Standard and Control) présentent les recommandations de l'OMS concernant le nouveau vaccin. Le NIBSC est

responsable de la production, du contrôle et de la distribution des lots de souches virales et des réactifs nécessaires à la production et aux contrôles des vaccins.

Le groupe décide alors d'entériner le choix de l'OMS ou de l'adapter en fonction du contexte épidémiologique en Europe.

Une fois la composition vaccinale enregistrée, elle est alors présentée pour approbation au groupe de travail sur les biotechnologies (CHMP).

Remarque : Le **Comité des médicaments à usage humain** (anglais : *Committee for Medicinal Products for Human Use*, communément abrégé CHMP) est un comité de l'Agence européenne des médicaments (EMA). Le CHMP évalue les demandes relatives aux médicaments dans le cadre des procédures centralisées d'AMM⁸. Il joue le rôle d'arbitre en cas de désaccord dans les procédures décentralisées de reconnaissance mutuelle. Ce groupe de travail est composé d'une assemblée d'experts européens qui se réunit une fois par mois dans les locaux de l'EMA à Londres.

Une notification officielle est alors établie par l'EMA, relayée au niveau national par chaque autorité compétente (en France : ANSM).

I.2.3 Mise à disposition des souches par le NIBSC

La dernière étape du processus consiste donc à proposer la nouvelle recommandation de l'OMS aux producteurs Européens de vaccin. Il faut ainsi leur communiquer le calendrier de mise à disposition des lots de souches virales et des antigènes et sérums fournis par le NIBSC pour la production et le contrôle des vaccins grippaux. Les producteurs peuvent alors mettre en place leur planning de fabrication et de distribution du vaccin contre la grippe saisonnière.

I.3 DEPOT REGLEMENTAIRE DU VACCIN CONTRE LA GRIPPE SAISONNIERE

I.3.1 Généralités

Il existe plusieurs types d'obtention d'AMM (Autorisation de mise sur le marché) en Europe.

- la procédure est dite « centralisée » lorsque l'AMM est accordée par la Commission européenne après avis du CHMP (EMA). L'AMM est alors accordée à tous les états membres. Elle concerne les produits innovants, tels que les médicaments issus de biotechnologies ;
- La procédure est nationale lorsque l'AMM est octroyée par l'Agence du médicament d'un État, et n'est valable qu'à l'intérieur de cet État. En France, l'AMM est délivrée par le Directeur Général de l'ANSM. Elle ne peut être octroyée que dans un seul des pays membres de l'Union Européenne ;
- La « procédure par reconnaissance mutuelle » (RPM, ou MRP en anglais) permet d'octroyer une AMM à certains États choisis par le demandeur, après l'octroi d'une AMM initiale par l'un des états membres ;
- La « procédure décentralisée » est identique à la procédure de reconnaissance mutuelle hormis le fait qu'aucun des états choisis n'a délivré une AMM initiale : l'évaluation est d'emblée partagée entre les états.

Ainsi, pour **une nouvelle demande** d'AMM pour le vaccin contre la grippe saisonnière les fabricants font une demande de reconnaissance mutuelle ou une procédure centralisée.

La particularité du vaccin grippal en ce qui concerne l'AMM est le fait de réactualiser chaque année le dossier d'AMM afin d'introduire la ou les nouvelles souches si besoin.

I.3.2 Modifications du dossier d'AMM pour changement de souche

Comme vu précédemment, il existe des laboratoires spécifiques qui fournissent les lots de semence virales, les antigènes et sérums grippaux qui permettent la production des vaccins et contrôles de qualité en cours de fabrication et au stade produit fini. Ces laboratoires sont : le NIBSC en Europe, le CBER (Center for Biological Evaluation and Research) et le Mount Sinai Hospital aux Etats Unis et le CSL (Commonwealth Serum laboratories) en Australie.

A partir de la distribution des souches aux laboratoires fabricants les vaccins grippaux, commence une véritable course contre la montre. Il s'agit d'être le premier sur le marché afin de conquérir les pays acheteurs. Les fabricants travaillent donc en flux tendu et doivent respecter les étapes suivantes pour obtenir le rectificatif de leur AMM :

Les recommandations selon le journal officiel de la commission Européenne pour le changement des souches du vaccin contre la grippe saisonnière sont :

« Fournir :

1. Version modifiée de la ou des sections concernées du dossier (dans le format UE-DCT ou le format de l'avis aux demandeurs, volume 6B, pour les médicaments vétérinaires, selon le cas).
2. Tableau comparatif des essais en cours de fabrication actuels et proposés.
3. Précisions sur toute nouvelle méthode d'analyse non mentionnée dans la pharmacopée et données de validation, le cas échéant.
4. Données d'analyse des lots sur deux lots de production (trois lots de production pour les lots biologiques, sauf justification contraire) de la substance active pour tous les paramètres de spécification.
5. Justification ou évaluation du risque par le titulaire de l'AMM ou le titulaire du DPSA, selon le cas, montrant que le paramètre n'est pas significatif.
6. Justification du titulaire de l'AMM ou du titulaire du DPSA, selon le cas, pour le nouvel essai en cours de fabrication ainsi que les limites. »

B.La.5. Changements dans la substance active d'un vaccin saisonnier, prépandémique ou pandémique contre la grippe humaine	Conditions à remplir	Documents à fournir	Type de procédure
a) Remplacement de la ou des souches d'un vaccin saisonnier, prépandémique ou pandémique contre la grippe humaine			II

Figure 3: extrait du journal officiel de la commission Européenne⁹

Les procédures de type II concernent l'examen des modifications considérées comme majeures des termes d'une autorisation de mise sur le marché de médicaments à usage humain et de médicaments vétérinaires.

Jusqu'en 2014, les fabricants de vaccin contre la grippe saisonnière devaient prouver la qualité du médicament distribué et justifier d'une étude clinique sur 50 sujets. Parmi les 50

sujets, on trouvait 2 types de populations : les 18-60 ans et les plus de 60 ans. Le but était d'évaluer 3 critères après injection du vaccin et de satisfaire au moins 1 des 3 critères :

- la séroconversion du sujet (40% pour les 18-60 ans)
- la séroprotection du sujet (78% pour les 18-60 ans et 60% pour les plus de 60 ans)
- l'augmentation de la moyenne du titre ($\geq 2.5\%$ pour les 18-60 ans et $\geq 2\%$ pour les plus de 60 ans)

Aujourd'hui, l'EMA ne demande plus d'étude clinique. Seule la qualité du médicament doit être prouvée afin d'obtenir le rectificatif d'AMM nécessaire pour la libération des lots de vaccin.

I.3.3 Rôle de l'ANSM

L'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicaments), l'autorité nationale compétente concernant les produits de santé intervient à différents niveaux :

- **Administratif** : il y a un relai national au sein de la DEV (Direction de l'évaluation) concernant les décisions de l'EMA notamment sur les notifications annuelles des nouvelles souches vaccinales.
- **Contrôle** : selon la directive Européenne 89/342/EEC, c'est la DLC (Direction des Laboratoires et des Contrôles) qui est chargée du contrôle de lot de tous les vaccins grippaux fabriqués sur le territoire français destinés au marché français et à l'exportation au sein de l'Union Européenne (ou hors d'Europe à la demande des fabricants). C'est elle qui est chargée de libérer le lot de vaccin après une lecture critique du protocole de production et de contrôle du fabricant. La libération des lots est faite avant le lancement des campagnes de vaccination hivernales pour l'hémisphère Nord.
- **Pharmacovigilance** : cette unité permet de surveiller et collecter les données liées aux effets indésirables après commercialisation afin de retirer du marché des lots de vaccins grippaux ayant provoqué des incidents, voire accidents post-vaccinaux.
- **Suivi** : deux experts internes participent aux groupes de travail sur la grippe à l'Agence Européenne et à la mise en place d'un plan de pandémie coordonné par la direction générale de la santé.

II. LE VACCIN CONTRE LA GRIPPE ET SA PREPARATION

II.1 ROLE DU VACCIN

II.1.1 Généralités

Les vaccins constituent une thérapie consistant à stimuler le système immunitaire de manière à obtenir une réponse spécifique de l'organisme contre un antigène, qu'il soit viral, bactérien, cellulaire ou même moléculaire. Les vaccins sont obtenus à partir de souches inoffensives de virus ou de bactéries, d'antigènes purifiés ou d'analogues antigéniques. On les utilise couramment en prévention pour éviter qu'un individu ne développe une maladie, mais ils peuvent aussi être utilisés une fois la pathologie déclarée, afin d'orienter la réponse immunitaire contre un envahisseur. Le vaccin contre la grippe lui, est un vaccin préventif

Le mot vaccin provient du fait que le premier traitement de ce type utilisait le virus de la vaccine (*vacca* = vache en latin) pour immuniser les sujets contre la variole.

Lorsqu'un agent étranger à l'organisme pénètre dans le corps, il est reconnu par le système immunitaire, qui, par l'intermédiaire de lymphocytes B va produire des anticorps, des molécules capables de reconnaître spécifiquement tout ou partie de l'agresseur potentiel. Ce processus est en plus couplé à un effet mémoire, qui permet à un organisme de se souvenir d'un pathogène, parfois de longues années après et d'accélérer les délais avant la réponse immunitaire.

Un vaccin consiste donc en l'injection d'un antigène (virus atténué ou inactivé, protéine de membrane bactérienne, etc.), de manière à susciter une réaction immunitaire avec effet mémoire pour permettre à un patient de se débarrasser d'un agent infectieux déjà présent à l'aide de ses défenses naturelles (vaccin thérapeutique), ou de préparer le corps à se confronter à l'avenir à un pathogène sans déclarer la maladie (vaccin préventif).

Le premier vaccin, mis au point par Louis Pasteur en 1885, a permis de combattre la rage. Depuis, la vaccination est devenue un processus courant, et un certain nombre de vaccins sont même obligatoires, comme ceux contre la diphtérie, le tétanos et la poliomyélite.

Le vaccin contre la grippe, recommandé pour une partie de la population à risque, doit quant à lui changer chaque année et s'adapter à la souche virale qui circule. Il s'agit d'un vaccin préventif composé de virion inactivé, fragmenté ou d'antigènes de surface. Les vaccins font parti d'une monographie générale dans la Pharmacopée Européenne (voir annexe 2).

II.1.2 Les différents types de vaccins contre la grippe saisonnière

Définitions des différents vaccins contre la grippe selon la pharmacopée européenne¹⁰ :

-Vaccin grippal inactivé (antigène de surface) : « Le vaccin grippal inactivé (antigène de surface) est une suspension stérile d'une ou plusieurs souches de virus grippal de type A et B, ou d'un mélange de souches des 2 types cultivés individuellement dans des œufs embryonnés de poules (ou sur des cultures cellulaires), inactivés et traités de façon à obtenir une préparation constituée principalement d'antigènes d'hémagglutinine et neuraminidase sans altérer les propriétés antigéniques de ces antigènes. »

-Vaccin grippal inactivé (antigène de surface, virosomal) : « Le vaccin grippal inactivé (antigène de surface, virosomal) est une suspension stérile, aqueuse, d'une ou plusieurs souches de virus grippal des types A et B, ou d'un mélange de souches des 2 types cultivées individuellement dans des œufs embryonnés de poules, inactivés et traités de façon à obtenir une préparation constituée principalement d'antigènes d'hémagglutinine et neuraminidase reconstitués en virosomes, sans altérer les propriétés antigéniques de ces antigènes. Le vaccin se présente sous la forme d'un liquide légèrement opalescent. »

Remarque : Les virosomes sont des pseudo-particules virales, constituées de l'enveloppe virale, sans aucun matériel *génétique* où l'*hémagglutinine* et la *neuraminidase* du virus grippal sont intercalées entre deux couches de *phospholipides* (voir schéma ci-dessous). Ils sont obtenus après solubilisation à l'aide d'un détergent et reconstruction. Ils ont une *morphologie* et des capacités de pénétration cellulaire identiques au virus original, et conservent leurs propriétés de fixation au récepteur cellulaire et de fusion membranaire qui sont propres à l'hémagglutinine virale. En raison de l'absence de l'*ARN* viral, les virosomes n'infectent pas les cellules avec lesquelles ils fusionnent.

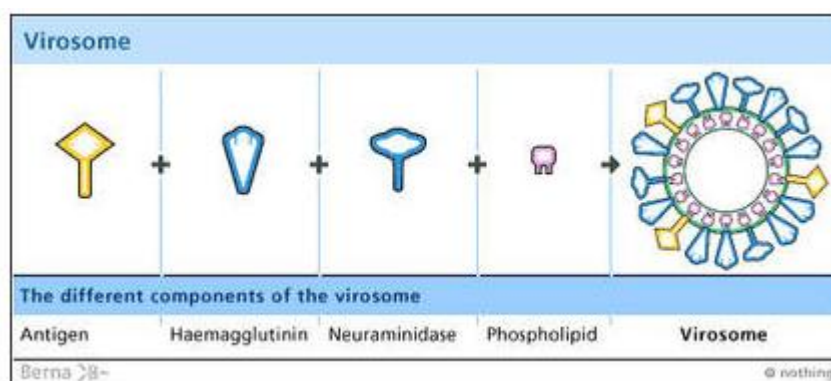


Figure 4: Schéma de la structure d'un virosome¹¹

-Vaccin grippal inactivé à virion entier : « Le vaccin grippal à virion entier est une suspension stérile, aqueuse, d'une ou plusieurs souches de virus grippal des types A et B, ou d'un mélange des 2 types cultivés individuellement dans des œufs embryonnés de poules (ou sur des cultures cellulaires) et inactivés de façon à conserver leurs propriétés antigéniques. Le vaccin se présente sous la forme d'un liquide légèrement opalescent ». Le virus est ainsi gardé entier mais désactivé, il conserve donc son matériel génétique, contrairement au virosome.

-Vaccin grippal inactivé à virion fragmenté : « Le vaccin grippal inactivé à virion fragmenté est une suspension stérile, aqueuse, d'une ou plusieurs souches de virus grippal des types A et B, ou d'un mélange des 2 types cultivés individuellement dans des œufs embryonnés de poules inactivés et traités de façon à fragmenter les particules virales sans altérer les propriétés antigéniques de l'hémagglutinine ou de la neuraminidase. »

Bien que le procédé de fabrication des souches de départ soit différent selon qu'il s'agisse d'antigène de surface, de virion... à partir d'œufs ou de cultures cellulaires, la fabrication de la suspension stérile reste la même. La préparation aseptique ainsi que la filtration stérilisante sont nécessaires.

II.1.3 Mécanisme du vaccin contre la grippe

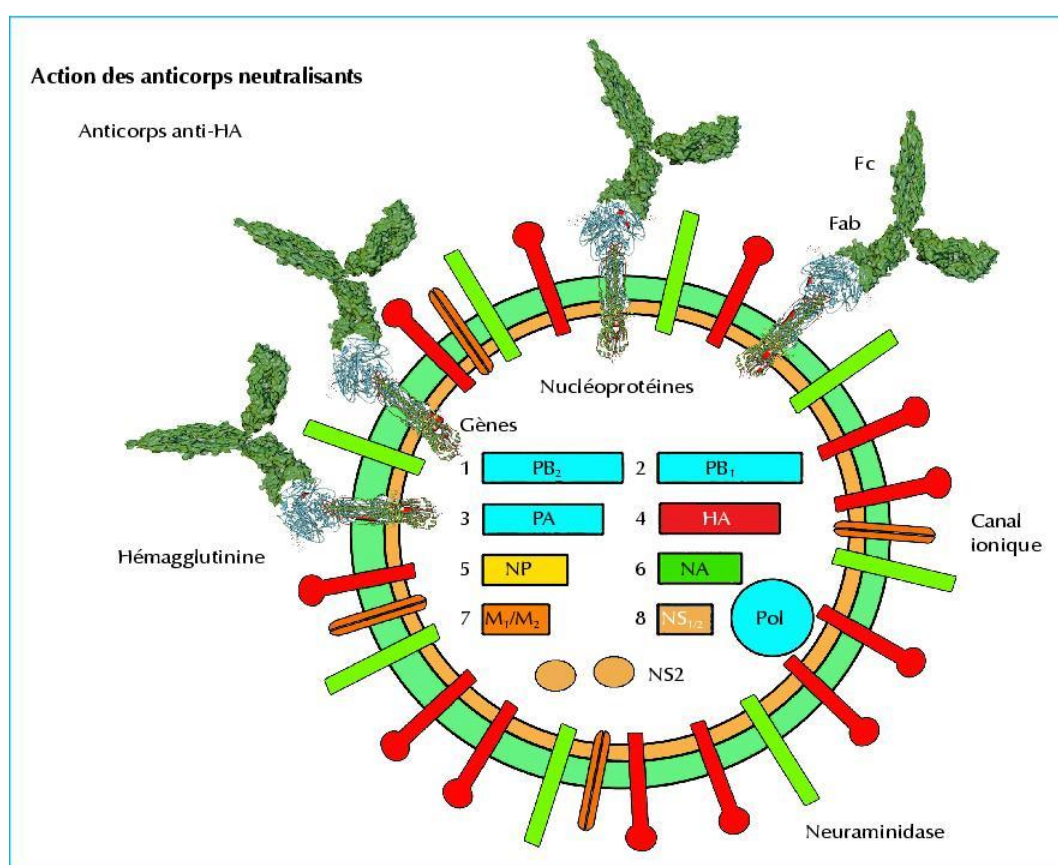


Figure 5: Action des anticorps neutralisants après vaccination.¹²

Dans la composition du vaccin sont présentes les protéines de surface : Hémagglutinine et Neuraminidase.

L'hémagglutinine génère des anticorps, qui inhibent l'hémagglutination et assurent la neutralisation du pouvoir infectieux ; ils sont spécifiques de sous-types et de variants (on peut voir sur le schéma les anticorps neutralisant le virus). La neuraminidase induit aussi des anticorps. Ceux-ci inhibent l'activité enzymatique de la neuraminidase (lyse des acides

sialiques), ils sont non neutralisants mais limitent la quantité de virus produits. Ils sont également spécifiques de sous-types et de variants.

II.2 FORMULATION DES VACCINS

II.2.1 La voie d'administration

Les virus de la grippe étant enveloppés, sont sensibles aux solvants des graisses puisqu'ils sont formés par une enveloppe lipidique. Ils sont donc détruits dans le tube digestif et ne sont pas retrouvés dans les selles chez l'homme. La voie d'administration choisie doit donc être parentérale. Parmi les préparations parentérales, le vaccin contre la grippe fait partie des « préparations injectables » et plus précisément des suspensions injectables.

Pour ce type de préparation injectable, les voies d'administration les plus courantes sont les voies intramusculaire et sous cutanée. Les injections intramusculaires sont pratiquées dans des régions éloignées du passage des fibres nerveuses au moyen d'une aiguille de plusieurs centimètres à biseau court et à large lumière.

En général, les suspensions injectables peuvent présenter un sédiment, qu'il est facile de disperser par agitation de façon à obtenir une suspension suffisamment stable pour permettre l'administration de la dose voulue.

Les modes et les voies d'administration des préparations parentérales sont à l'origine de la qualité requise par la Pharmacopée.

Les préparations injectables satisfont aux essais suivants:¹³

- la stérilité
- la contamination particulière (dans le cas des préparations pour administration sous cutanée ou intramusculaire, des limites plus élevées peuvent être appropriées)
- uniformité des préparations unidoses : uniformité de teneur-, essai des volumes extractibles
- essai des endotoxines bactériennes-pyrogènes

Les récipients destinés aux préparations parentérales sont constitués, dans la mesure du possible, de matériaux suffisamment transparents pour permettre la vérification visuelle de l'aspect du contenu, sauf dans le cas des implants et d'autres cas justifiés et autorisés. Les préparations parentérales sont conditionnées en récipient de verre ou d'autres récipients tels que les récipients en matière plastique et des seringues préremplies.

II.2.2 La composition de la suspension de vaccin

Les préparations parentérales peuvent nécessiter l'emploi d'excipients, par exemple pour assurer l'isotonie au sang, ajuster le pH, augmenter la solubilité, permettre la conservation de la (ou des) substance(s) active(s), assurer une action antimicrobienne. Ces excipients n'affectent pas l'action médicamenteuse recherchée et, aux concentrations choisies, ne provoquent pas de phénomènes de toxicité ou d'irritation notable.

Les vaccins grippaux sont constitués de :

- Principe Actif :
 - **souches** : A et B (définies par l'OMS et distribuées aux fabricants). La préparation des souches sera vue en détail dans chapitre suivant (II.3)
- Excipients :
 - **Eau PPI** (eau pour préparation injectable) : l'eau PPI en vrac est obtenue soit à partir d'eau destinée à la consommation humaine, comme établie par l'autorité compétente, soit à partir d'une eau purifiée, par distillation dans un appareil dont les surfaces en contact avec l'eau sont constituées de verre neutre, de quartz ou d'un métal approprié.¹⁴ l'eau PPI en vrac est conservée et distribuée dans des conditions visant à empêcher la croissance de microorganismes et à éviter toute autre contamination.
 - **Tampon** : permet de rendre les préparations à injecter isotoniques au plasma sanguin. Exemple : Chlorure de sodium, phosphate disodique dihydraté, chlorure de calcium dihydraté, chlorure de magnésium hexahydraté, phosphate monopotassique, chlorure de potassium
 - **Agent de surface** (tensioactifs) : permettent d'améliorer le mouillage. Par exemple : le polysorbate 80
 - **Les adjuvants**¹⁵ : ils stimulent l'immunité non spécifique, première étape avant la mise en place de l'immunité spécifique. Beaucoup d'adjuvants correspondent à des fragments bactériens (peptidoglycanes, acides lipoteichoïques, flagelline, CpG non méthylé) ou sont d'origine virale (glycoprotéines), fongique ou synthétique (analogue de lipide A, ARN double brin, polyC...).

Pendant plus de 80 ans, des adjuvants à base d'hydroxyde d'aluminium ont été utilisés. Ils sont satisfaisants malgré la possibilité de réactions locales (érythème, nodule douloureux...). Ces adjuvants permettent la séquestration et la libération progressive de l'antigène depuis le lieu d'injection et potentialisent la réponse immune par induction d'une réaction inflammatoire locale avec stimulation directe des cellules immunitaires (macrophages), mais ils sont peu inducteurs de la réponse à médiation cellulaire. Ex : MF59 (émulsion huile dans eau de squalène, tween 80 et trioléate de sorbitol) était utilisé dans Gripguard® car il est destiné aux personnes âgées dont les

défenses immunitaires sont affaiblies (Ce médicament a subi une suspension de commercialisation en 2011).

- Substances présentes à l'état de trace utilisées pour la fabrication :
 - **Conservateurs antimicrobiens (antiseptiques)**: ils sont indispensables pour les préparations multidoses mais aussi pour les préparations difficilement stérilisables (car on ne peut pas utiliser la stérilisation terminale par autoclave) comme les vaccins à virus inactivés. Les conservateurs antimicrobiens sont souvent classés « excipient à effet notoire » car ils peuvent provoquer des réactions de type allergique. Exemple : CTAB : Cetyl trimethylammonium bromide, Octoxynol-9
 - **Les antibiotiques** : ils sont utilisés afin de prévenir l'infection des cultures cellulaires durant le temps de la préparation des vaccins mais peuvent servir aussi à la conservation du produit fini. Sont notamment retrouvées à l'état de trace, la *néomycine* et *kanamycine* en association ou la *gentamicine*.
 - **Antioxydants** : ces conservateurs sont nécessaires pour protéger les substances actives oxydables. Ils doivent être utilisés avec prudence car des accidents thérapeutiques (allergies, choc anaphylactique) peuvent leur être attribués. Beaucoup de ces excipients sont classés « à effet notoire ». Sont utilisés :
 - Des substances réductrices hydrosolubles comme les sulfites et dérivés, l'acide ascorbique, ou liposoluble, comme les tocophérols, les esters d'acide ascorbique
 - Des complexants des ions métalliques qui peuvent exister à l'état de traces dans les solutions et qui jouent le rôle de catalyseurs de l'oxydation, comme par exemple l'acide édétique et ses sels (mais ils sont toxiques par complexation du calcium) ou certains acides aminés.
 - Substances liées à **l'inactivation des virus (présentes à l'état de traces)** : β propiolactone ou formaldéhyde pour les virus entiers inactivés. Ethyl ether, sodium dodecyl sulfate pour les virus fragmentés ou détergents pour les vaccins à antigènes de surface.

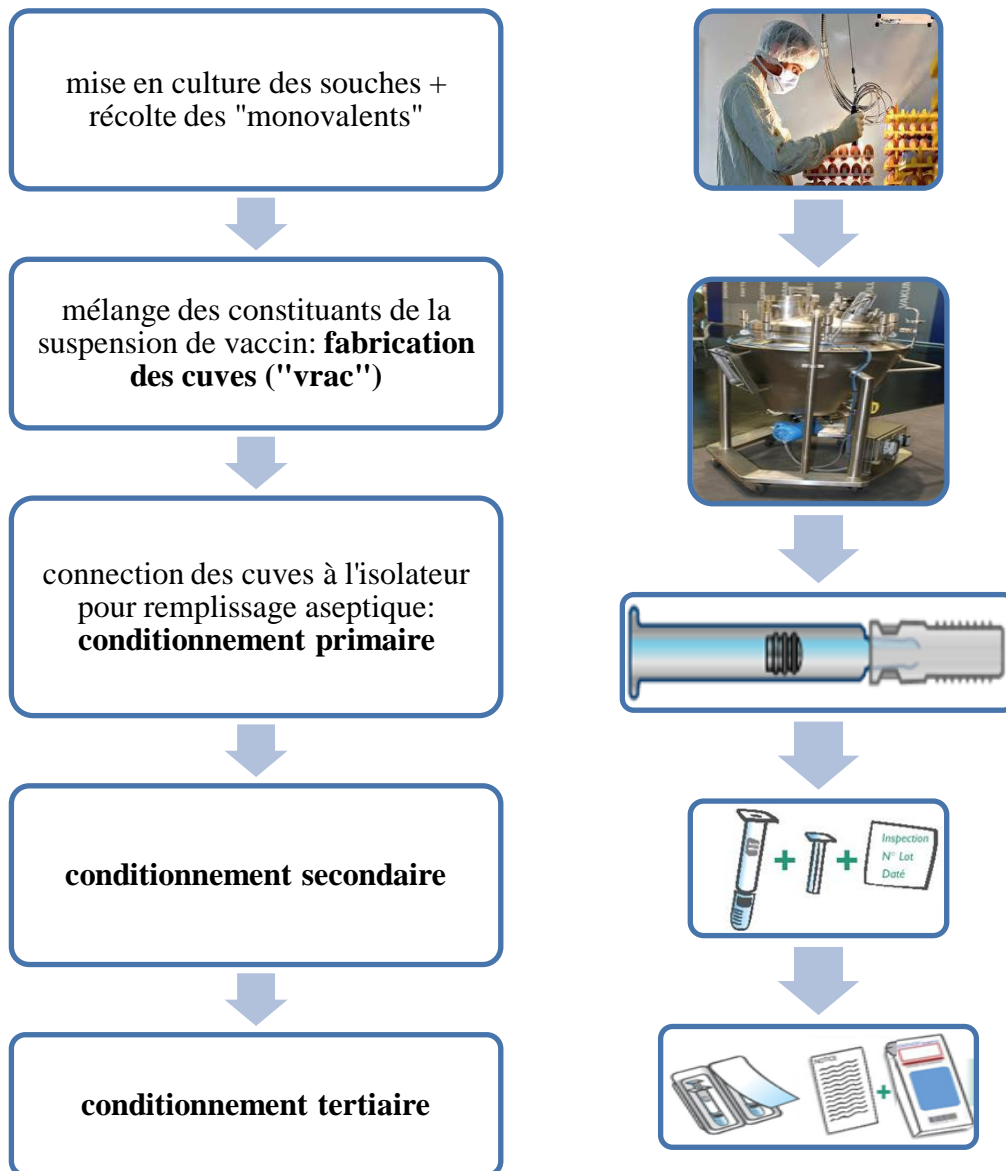
	Aggripal®	Fluarix®	Immugrip®	Influvac®	Optaflu® cultures cellulaires	Vaxigrip®
Type	Antigènes de surface	Virion fragmentés	Virion fragmentés	Antigènes de surface	Antigènes de surface	Virion fragmenté
Souches vaccinales analogues à :	<ul style="list-style-type: none"> - A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 - A/Victoria/361/2011 (H3N2) - B/Massachusetts/2/2012 					
Excipients	<ul style="list-style-type: none"> -Chlorure de sodium, -chlorure de potassium, -phosphate monopotassique -phosphate disodique dihydraté, -chlorure de magnésium hexahydraté, -chlorure de calcium dihydraté -eau pour préparations injectables 	<ul style="list-style-type: none"> -chlorure de sodium, phosphate disodique dodécahydraté, -phosphate monopotassique, -chlorure de potassium, -chlorure de magnésium hexahydraté, -hydrogénosuccinate d'alpha tocophéryle, - polysorbate 80, - eau ppi. 	<ul style="list-style-type: none"> -chlorure de sodium, -phosphate disodique dihydraté, phosphate monopotassique, -chlorure de potassium - eau ppi 	<ul style="list-style-type: none"> -chlorure de potassium, -phosphate monopotassique, -phosphate disodique dihydraté, -chlorure de sodium, -chlorure de calcium dihydraté, -chlorure de magnésium hexahydraté, -eau ppi 	<ul style="list-style-type: none"> -chlorure de sodium, -chlorure de potassium hexahydraté, -phosphate disodique dihydraté, -phosphate monopotassique, - eau ppi 	<ul style="list-style-type: none"> -chlorure de sodium -phosphate disodique dihydraté, -phosphate monopotassique, chlorure de potassium, -eau ppi
Résidus de fabrication	<ul style="list-style-type: none"> - sulfate de kanamycine et de néomycine, - formaldéhyde, - Cetyl triméthylammonium bromide (CTAB), - polysorbate 80 - sulfate de baryum 	<ul style="list-style-type: none"> - formaldéhyde - sulfate de gentamicine - désoxycholate de sodium - octoxinol 10, 	<ul style="list-style-type: none"> - traces de néomycine, - formaldéhyde - octoxinol-9 	<ul style="list-style-type: none"> - formaldéhyde, - Cetyl triméthylammonium bromide, - polysorbate 80 - gentamicine 		<ul style="list-style-type: none"> - néomycine, - formaldéhyde - octoxinol-9
Laboratoire	Novartis®	GlaxoSmithKline®	Pierre Fabre®	Abott products®	Novartis®	Sanofi Pasteur MSD®

+ **Fluenz®** : vaccin intra nasale (vaccin vivant atténué). Composition des vaccins présents sur le marché Français extraites de eVidal

II.2.3 Le vaccin contre la grippe : préparation aseptique

Pour vaccin contre la grippe, la stérilisation terminale n'est pas réalisable. La filtration stérilisante avec un type de filtre particulier satisfait l'épreuve microbienne réalisée avec un microorganisme d'essai approprié. La filtration stérilisante utilise des filtres de $0.22\mu\text{m}$, celle du virus de la grippe varie entre 80 et 120 nm. Les virosomes ne sont donc pas retenus sur le filtre¹⁶. Il est recommandé d'effectuer la filtration aussi près que possible du point de remplissage. Les opérations qui suivent la filtration stérilisante sont réalisées dans des conditions aseptiques.

Le schéma ci-dessous permet d'illustrer les différentes étapes de la fabrication du vaccin contre la grippe saisonnière. Chaque étape sera détaillée dans la suite de ce travail.



II.3 PREPARATION ET CONTROLE DES SOUCHES

II.3.1 Mise en culture des souches

Chacune des souches virales déterminées par l'OMS est injectée et mise en culture sur des œufs de poule embryonnés d'une dizaine de jours ou sur des cultures cellulaires. C'est au moment de cette multiplication ou au moment de la récolte qu'un agent antimicrobien peut être ajouté à l'inoculum (ni pénicilline ni streptomycine ne sont utilisées pour la production du vaccin).

-Pour la mise en culture sur **œuf** : les souches sont inoculées dans le liquide allantoïque des œufs embryonnés (« sains »).



Figure 6: illustration de l'inoculation des oeufs

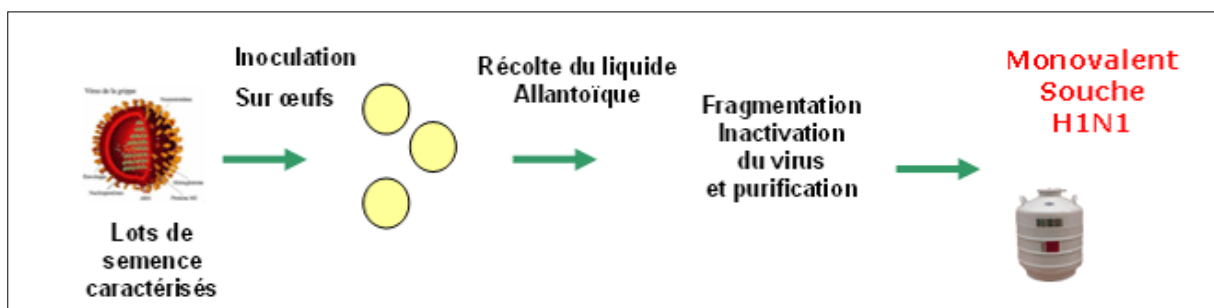


Figure 7: Schéma de production de monovalents faite sur œufs¹⁷

-Pour la mise en culture sur **cellule** (seul vaccin concerné : Optaflu®) : les souches sont inoculées à une culture cellulaire produite dans un fermenteur. Après incubation et amplification, les cellules sont détruites (=lyse) afin de récupérer le virus. Les cellules utilisées proviennent de cultures sur lesquelles de nombreux tests microbiologiques ont été

réalisés afin d'en assurer la sécurité. Ce produit fait donc partie des produits dits de « biotechnologie »

La mise en culture sur cellule a été développée pour différentes raisons. :

- Les stocks d'œufs de poule embryonnés doivent être prévus près de 6 mois à l'avance pour le démarrage de la production du vaccin contre la grippe saisonnière. Les œufs sont utilisés par les laboratoires qui distribuent les souches aux fabricants de vaccin et par les fabricants eux même. Depuis plusieurs dizaines d'années, des chercheurs développent la mise en culture sur cellule et par exemple sur des cellules de rein canines (MDCK). Le développement des virus sur culture cellulaire est rapide et ne dépend pas de la disponibilité en œufs.
- Cette méthode serait donc utile en cas de pandémie puisque les cultures cellulaires peuvent être stockées au congélateur, ceci permettrait de mettre rapidement un vaccin pandémique sur le marché.

Ce vaccin dont le virus a été cultivé sur cellule permet aussi de cibler une partie de la population allergique aux protéines de l'œuf, notamment l'albumine.¹⁸

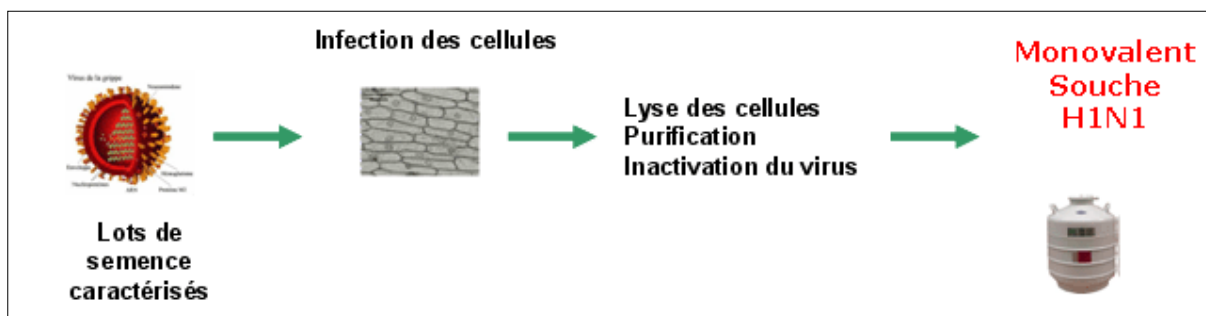


Figure 8: Schéma de la production de monovalents faite sur des cellules¹⁹

II.3.2 Traitement des souches récoltées pour obtention des monovalents

Comme observé sur les figures 7 et 8, les récoltes de souches subissent de nombreux traitements afin d'obtenir les « monovalents » qui serviront pour la fabrication de la suspension « vrac » finale. Ces monovalents sont les souches de virus inactivées (rendues inoffensives pour l'homme) et préparées selon le schéma de fabrication de chacun des laboratoires. Le schéma de fabrication sera différent selon qu'il s'agisse d'un vaccin inactivé à virion fragmenté ou à antigène de surface. Les souches vont ainsi d'abord subir une phase d'**inactivation** par le formaldéhyde (Vaxigrip®), la β propiolactone (pas utilisée pour les vaccins du marché Français en 2014) ou par l'association du formaldéhyde avec le désoxycholate (Influvac®/Aggripal®). Qu'il s'agisse d'une inactivation par le **formaldéhyde**, par la **bétapropiolactone** ou par un détergent, il est nécessaire de contrôler le pourcentage de substance utilisée pour ne pas détruire le pouvoir antigénique du virus. La β propiolactone, le formaldéhyde ou le détergent agit sur l'acide nucléique viral et inactive le virus sans modifier ses propriétés antigéniques.

Les souches subissent ensuite une fragmentation pour **les vaccins inactivés à virions fragmentés**. Cette fragmentation est réalisée grâce à l'octoxynol-9, le désoxycholate de sodium ou le tween-éther. Ces substances permettent de rendre la membrane des cellules perméables pour la fragmentation.

- Les souches subissent une phase d'extraction sélective pour **les vaccins à antigènes de surface**. Il existe deux procédés d'extraction des antigènes de surface :
 - La solubilisation de la membrane virale par un détergent (ex : monoxynol), suivi d'une centrifugation zonale en gradient de saccharose
 - La solubilisation sélective des antigènes de surface du virus par le céthyltriméthylammonium

A l'issue de ces étapes, sont obtenus les vaccins grippaux inactivés à virions fragmentés ou à antigènes de surface **monovalents**.

- Ces monovalents subissent également une étape de filtration stérilisante.

D'après la Pharmacopée Européenne : « Seul un lot de semence de travail qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du mélange de récoltes monovalent :

- Contamination bactérienne et fongique
- Mycoplasmes »

La réalisation du « vrac » correspond au mélange des récoltes des différents monovalents purifiés après réalisation des essais ci dessus. Le mélange s'effectue donc entre les deux souches A et au moins une souche B car aujourd'hui les vaccins sont au moins trivalents.

II.3.3 Validation de la suspension vrac

Une fois ce mélange de récoltes réalisé, des tests sont nécessaires pour valider cette suspension.

Il faut en effet, déterminer **la teneur en antigène** (d'une part l'hémagglutinine et d'autre part la neuraminidase).

Enfin, des essais **de pureté** sont réalisés afin de vérifier que les procédés de fragmentation et la purification n'entraînent pas la formation de composants supplémentaires pouvant compromettre la qualité et l'innocuité du produit.

Le vrac terminé doit satisfaire le test de stérilité. La **stérilité** de cette préparation doit être démontrée selon les essais décrits dans la pharmacopée.

Le vrac final peut alors être réparti aseptiquement dans des récipients stériles et inviolables : les seringues. Ces seringues sont fermées de façon à prévenir toute contamination.²⁰ Un lot final ne peut être libéré que s'il satisfait aux exigences spécifiées dans « Identification », « Essai » et « Activité » de la Pharmacopée. Si les essais Osmolarité, teneur en protéines, Distribution de taille moléculaire, conservateur antimicrobien, stabilisant, pureté, protéines étrangères, albumine, et titrage de l'activité ont été effectués avec des résultats satisfaisant sur le vrac, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final de produit fini (seringues).

Notre propos concernera le remplissage des seringues avec la suspension vrac finale.

III. FABRICATION DU VACCIN EN SERINGUES PRE-REMPLIES

III.1 PREPARATION DE L'ENVIRONNEMENT DE TRAVAIL

III.1.1 Généralités sur les conditions de fabrication

L'objectif de la préparation aseptique est de maintenir la stérilité d'un produit obtenu à partir de composants préalablement stérilisés par des méthodes citées plus bas. Le moyen d'atteindre cet objectif est d'opérer dans des conditions et au sein d'installations conçues pour empêcher la contamination microbienne. La préparation aseptique peut comprendre le remplissage et la fermeture aseptique des récipients, le mélange aseptique des composants suivi du remplissage et du conditionnement aseptique.

Le procédé de fabrication dans son ensemble doit suivre les Bonnes Pratiques de fabrication afin de garantir la qualité pharmaceutique, la stérilité du produit et d'assurer la traçabilité des lots fabriqués.

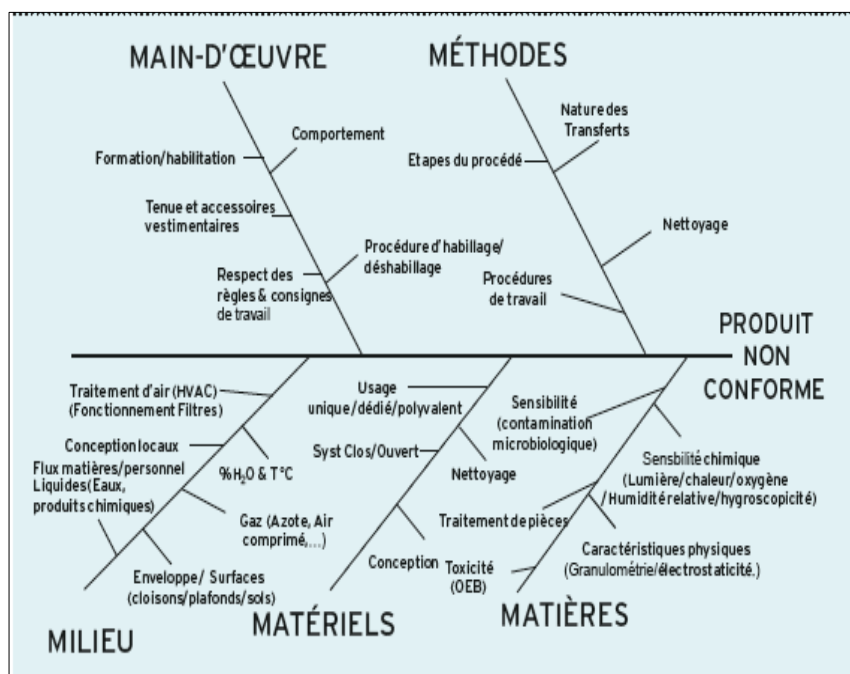


Figure 9: Diagramme d'Ishikawa²¹

Le diagramme d'Ishikawa se structure autour du concept des 5M. Ishikawa recommande de regarder l'évènement sous 5 aspects différents : Méthode, Main d'œuvre, Milieu, Matériels, Matières. Le diagramme représente de façon graphique les causes pouvant avoir des effets sur la qualité du produit. Les Bonnes pratiques de fabrication représentent ces 5 M.

III.1.2 Préparation des conditions de travail : milieu, main d'œuvre, méthodes et matière

1) Milieu

La conception des locaux participe à l'assurance de la stérilité. Dans les zones à atmosphère contrôlée (ZAC), les surfaces doivent être lisses, imperméables, sans fissures, avec un minimum d'anfractuosités pour réduire l'accumulation de micro-organismes. Il faut pouvoir y utiliser de manière répétée des produits de nettoyage et des désinfectants. Ces détergents et désinfectants eux-mêmes doivent être stériles et renouvelés pour éviter que ne se développent des souches résistantes.

Le matériel, les appareils et les installations techniques dans les zones de production stériles doivent être conçus et installés pour qu'un maximum de maintenance et de réparations puissent s'effectuer hors de la zone à atmosphère contrôlée. Le vide de chaîne (ou vide de ligne) est procédé et suivi à chaque changement de lot et précède le nettoyage.

Quatre classes distinguent entre eux les locaux dont l'atmosphère est contrôlée : les classes C et D, où se font les opérations les moins critiques en regard de l'asepsie, comme la préparation des solutions et celle du matériel de production, la classe B, qui forme une enceinte autour de la classe A, et la classe A qui caractérise le local dans lequel s'effectue le remplissage d'un produit injectable.

L'atmosphère qui garantit ces classes est obtenue par une filtration (stérilisante pour la classe A) de l'air dont l'efficacité correspond au niveau de propreté requis, par l'installation des équipements de production sous des systèmes à flux d'air unidirectionnel, par le passage des opérateurs de production de sas en sas... Une surveillance microbiologique régulière de cet environnement est effectuée à l'aide de boîtes de Pétri et par des contrôles des surfaces (pièces de machines, cloisons..)

L'isotechnie a été conçue pour réduire sensiblement les risques de contamination de l'environnement des produits fabriqués de façon aseptique. Elle consiste à créer une barrière physique entre l'opérateur, qui se trouve dans une zone non-stérile, et les équipements dans lesquels se déroulent les étapes critiques du remplissage et du bouchage des médicaments injectables. Les installations de remplissage sont protégées par une enceinte, de préférence rigide et en surpression. Les manipulations s'effectuent généralement de l'extérieur, à travers des «boîtes à gants» ou des demi-scaphandres.



Figure 10: exemple de "boîte à gant" pour remplissage aseptique

La préparation du matériel avant l'arrivée dans l'isolateur sera décrite ultérieurement.

2) Main d'œuvre

Chaque personne travaillant dans les locaux de production suit, en préalable à tout travail autonome, des **formations** qui la certifient à exercer les tâches qui lui seront confiées. Cette formation et cette qualification initiale sont ensuite relayées par une formation continue et une revalidation périodique qui assurent le respect des bonnes pratiques de fabrication.

Les **vêtements** de travail portés par les opérateurs de production participent au dispositif de contrôle des particules dans les locaux classés. Pour les personnes travaillant en classe B ou C : les tenues, elles-mêmes stériles, sont donc conçues pour ne libérer ni fibres ni particules et doivent retenir les particules émises par l'opérateur. Enfilée selon une gestuelle stricte, cette tenue comprend une cagoule qui enferme totalement les cheveux, un masque couvrant le bas du visage et des lunettes raccordant cagoule et masque. Une combinaison serrée aux poignets avec un col montant est complétée par des bottes qui enserrant le bas du pantalon et des gants qui enserrant les poignets.



Figure 11: exemple de tenue destinée à la zone à atmosphère contrôlée de type B ou C

La conception des vestiaires participe également au contrôle de la contamination : ceux-ci sont fractionnés selon les phases d'habillage de façon à ce que l'enfilage des vêtements se termine dans un local de la même classe que la zone à laquelle il mène.

3) Méthode

Le procédé de fabrication est procéduré et tous les paramètres entrant dans ce procédé sont contrôlés. Plusieurs fois par an, sont réalisés des MFT ou TRA (Media Fill Test/Test de Remplissage Aseptique). Il faut simuler les phases d'un procédé aseptique par l'utilisation d'un milieu de culture dans des conditions proches de celles subies par le produit en introduisant des conditions limites défavorables (Worst case).

Le but est de valider l'asepsie du procédé, évaluer le risque de produire des unités non stériles et d'évaluer la formation du personnel.

4) Matière

Les cuves de suspension vrac sont directement reliées à l'enceinte stérile. La préparation de la suspension vrac a été décrite précédemment.

III.1.3 Préparation du matériel

Le matériel utilisé doit être exempt de toute contamination.

Différents moyens sont utilisés pour garantir la stérilité du matériel avant le début du remplissage.

Il existe trois catégories de matériel :

-**le matériel autoclavable** (appareils en inox et tuyaux comme la panoplie de filtration)

-**le matériel non-autoclavable** (comme les chiffonettes, les colrings, le matériel microbiologique pour les prélèvements...)

-**les consommables** (qui sont livrés stériles sous sachets)

1) Préparation du matériel autoclavable :

-Nettoyage **du gros matériel** : c'est-à-dire tout le matériel de répartition en inox (aiguilles, pompes, tubes d'introduction, tiges d'enfoncement...) Il n'est pas nécessaire d'être en zone classée pour la préparation de ce matériel puisqu'il est stérilisé par autoclave par la suite.

Ce matériel est d'abord nettoyé en utilisant les ultrasons, l'alcool, rincé à l'eau PPI puis séchage à l'étuve.

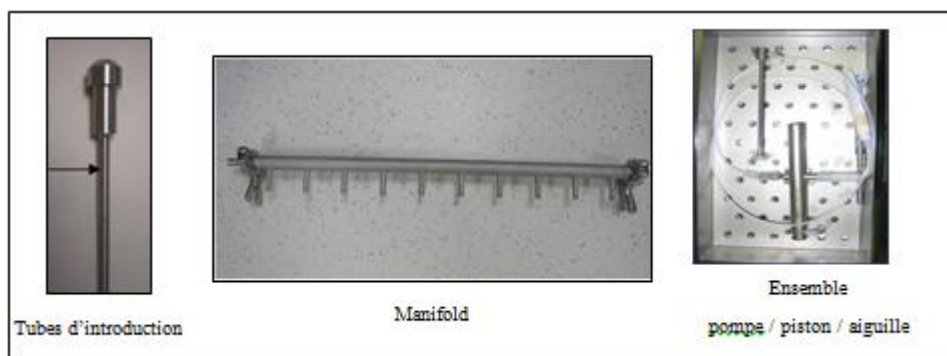


Figure 12: exemples de matériel utilisé pour le remplissage aseptique

-Nettoyage du petit matériel : c'est-à-dire tout le matériel en contact avec la préparation (barreau magnétique, outils (clés outils) et accessoires (bêchers, panier inox)).

Le nettoyage est le suivant : trempage dans l'alcool, rinçage à l'eau PPI et séchage à l'étuve.

-Nettoyage des tuyaux neufs et des raccords à l'eau PPI puis séchage à l'air comprimé

- Assemblage et ensachage du matériel pour la mise en autoclave. Selon la Pharmacopée Européenne, la stérilisation se fait à 121°C pendant 15min²².

- Désensachage du matériel et installation au fur et à mesure sous flux laminaire dans la zone de remplissage.

2) Préparation du matériel non-autoclavable :

-Préparation du matériel en ZAC de classe C

-Désinfection du matériel par brumisation d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et d'acide peracétique dilué dans de l'eau purifiée par exemple.

3) Composants consommables :

-Ces composants stérilisés chez le fournisseur doivent être retirés des sachets sous hotte à flux laminaire. Le contrôle à réception des consommables a donc beaucoup d'importance ici.

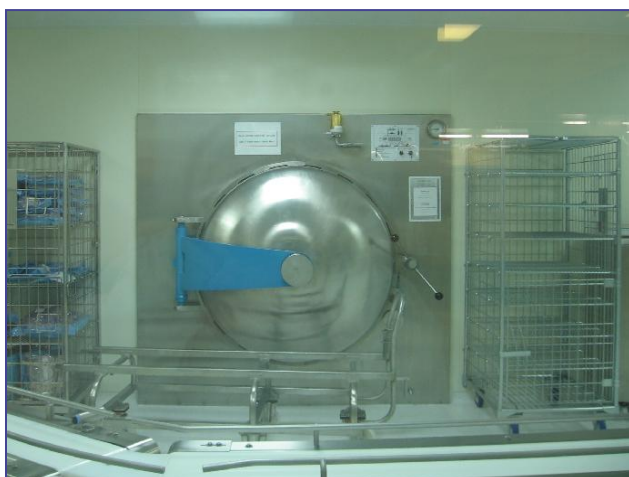


Figure 13: exemple d'autoclave

III.2 REMPLISSAGE

III.2.a Définition du remplissage aseptique

A cette étape du processus, la suspension vrac est remplie dans les contenants à savoir les seringues. Cette opération est souvent qualifiée de “répartition” dans le langage pharmaceutique. Elle s’effectue à l’intérieur d’un isolateur de classe A (ou « boîte à gants ») sous hotte à flux unidirectionnel dans un local de classe B ou C. Le contenant est immédiatement fermé de manière hermétique par le joint de piston, ce qui permet de le sortir de la zone stérile de classe A, puisque le médicament qu’il contient est maintenant protégé de toute contamination par le joint de piston.

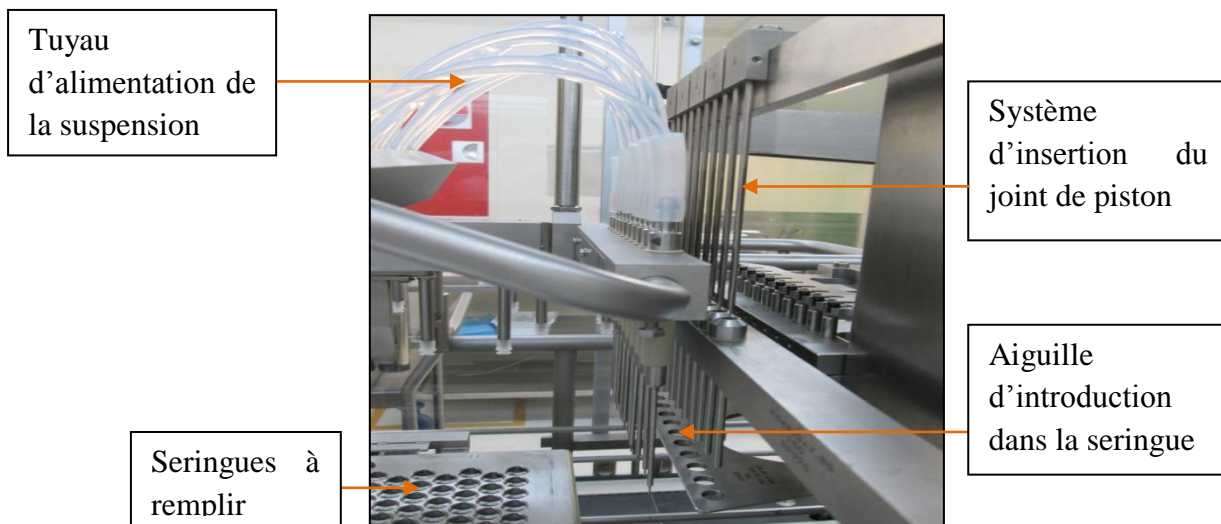


Figure 14: système qui permet le remplissage aseptique des seringues

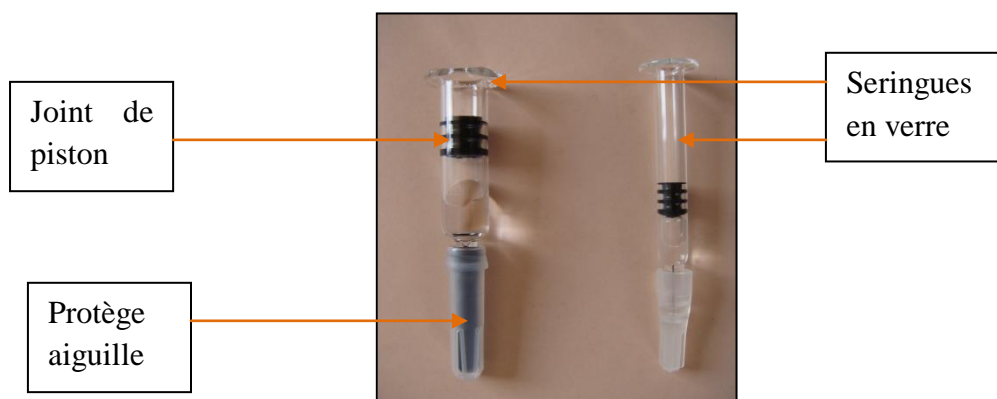


Figure 15: exemple de seringues utilisées pour la fabrication du vaccin contre la grippe saisonnière

III.2.b Les étapes du remplissage aseptique

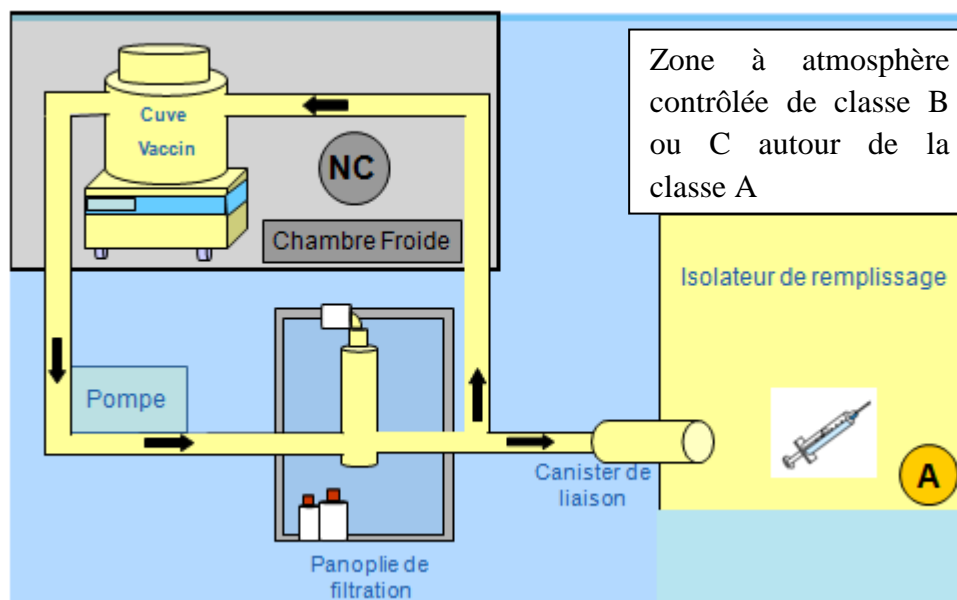


Figure 16: schéma de l'environnement de remplissage pour la suspension²³

Sur le schéma est décrit l'environnement de travail pour le remplissage aseptique du « vrac » vaccin. La cuve de vaccin est en chambre froide (zone à atmosphère non contrôlée entre 2°et 8°C), le système de filtration se situe lui, en zone à atmosphère contrôlée de classe A, B ou C. En ce qui concerne la zone de remplissage, le produit étant en contact pendant un court instant avec l'air ambiant (entre l'aiguille de remplissage et l'intérieur de la seringue). La zone doit être stérile. Il s'agit d'une zone à atmosphère contrôlée de type A (par exemple : isolateur ou « boîte à gants »). L'étape de remplissage consiste à remplir la seringue de suspension stérile d'une part et insérer le joint de piston dans la seringue d'autre part. Ces étapes sont effectuées dans l'isolateur. Pendant le remplissage, la température du vaccin augmente, il faut donc tracer ce temps hors réfrigération (THR ou TOR) et vérifier que la température reste inférieure à 25°C. Ce THR est suivi tout au long du procédé de mirage et de conditionnement.

Les seringues stériles et joints de piston arrivent en parallèle de la suspension (non visible sur le schéma). Les seringues arrivent dans des bacs fermés par des sachets hermétiques et les joints de piston arrivent en sachet sous vide. Une étape dite de « désensachage » sous hotte à flux laminaire a lieu avant l'entrée des bacs de seringues et joints de piston dans l'isolateur. Les bacs ressortant de l'isolateur contiennent les seringues remplies de suspension et bouchées par les joints de piston.



Figure 17: exemple de boîte à gant permettant le retrait des sachets des composants stériles

III.2.3 Les contrôles effectués au remplissage

Au cours du remplissage, sont réalisés des contrôles « en cours » : IPC (*In Process Control*). Le volume de remplissage et la hauteur de joint de piston sont contrôlés. Cela permet donc de suivre en temps réel le procédé de remplissage aseptique d'un lot de vaccin. Des prélèvements sont réalisés pour chaque lot de vaccin afin de contrôler la stérilité et effectuer les essais des endotoxines bactériennes. D'autres part, des seringues de chaque lot sont conservées en archive chez le producteur.

III.3 MIRAGE

III.3.a Définition du mirage

Selon les BPF²⁴ : « Après la répartition, les produits à usage parentéral doivent subir un contrôle individuel destiné à détecter tout corps étranger ou autre défaut. Lorsque ce contrôle est effectué visuellement, il doit être fait dans des conditions appropriées de lumière et d'arrière-plan préalablement déterminées. Les opérateurs effectuant ce contrôle subissent des examens oculaires réguliers, avec leurs verres correcteurs s'ils en portent, et ont droit à des pauses répétées. Lorsque l'on utilise d'autres méthodes de contrôle, le procédé doit être validé et le bon fonctionnement de l'appareillage contrôlé régulièrement. Les résultats des contrôles doivent être enregistrés. »

Le mirage est l'étape d'inspection individuelle des seringues, un contrôle à 100% est réalisé. Cette étape est donc extrêmement dépendante des performances du remplissage.

Le mirage est un procédé de tri, et non de contrôle qualité final. Des contrôles qualité sont donc réalisés pour chaque lot après mirage, pour assurer la conformité des seringues mirées.

III.3.b Les étapes du mirage

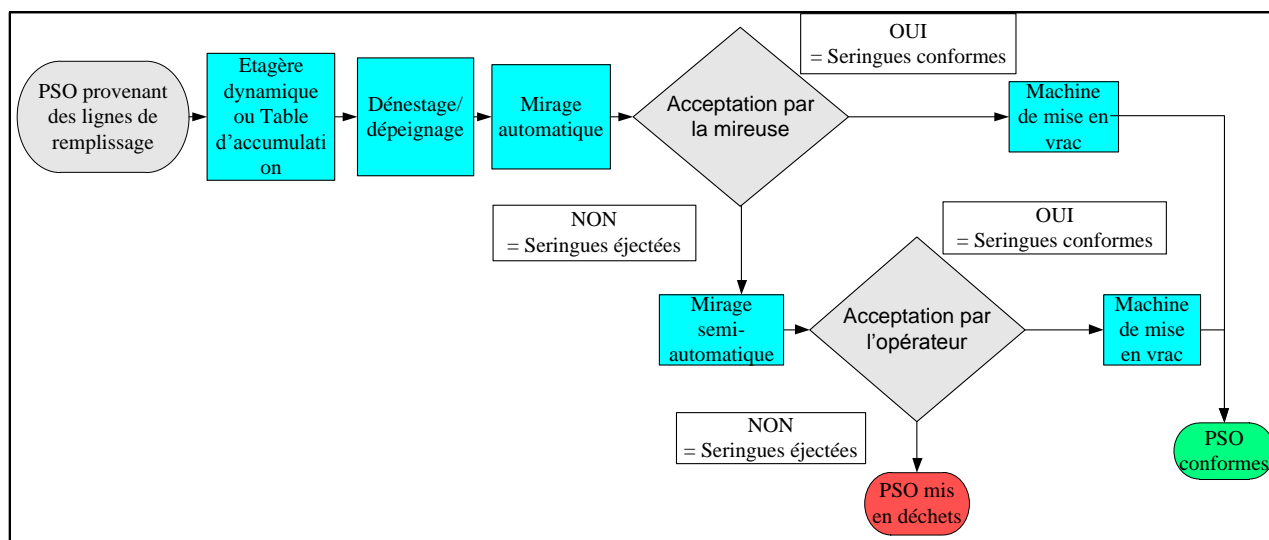


Figure 18: Logigramme du procédé de mirage

Les seringues de vaccin à mirer arrivent la plupart du temps en bac dans une grille. L'étagère dynamique ou table d'accumulation est alimentée en bacs par un opérateur.

Le dénesteur/dépeigneur vide les bacs de leurs seringues qui sont ensuite amenées à la mireuse automatique par un convoyeur. Deux types de mirage sont utilisés : l'automatique et le semi automatique. Le mirage automatique est utilisé en première intention, le mirage semi-automatique est utilisé en seconde intention lorsque des défauts sont détectés au cours d'un

lot. Il s'agit de vérifier si les défauts détectés au mirage automatique sont réellement présents dans le lot de seringues.

Les seringues mirées conformes sont placées dans des bacs par la machine de mise en vrac située en sortie de mireuse automatique. Ces bacs sont ensuite placés dans une grille «mireuse automatique ».

Les seringues mirées non conformes sont remirées par un opérateur en mireuse semi-automatique. Les seringues remirées conformes sont mises en vrac dans des bacs par la mise en vrac sortie de mireuse semi-automatique et ces bacs sont placés dans une grille mireuse « semi-automatique ». Les seringues remirées non conformes sont mises en déchet.

III.3.c Les contrôles effectués au mirage

Les contrôles effectués par les caméras des mireuses sont :

- ▶ Collerette cassée et présence joint de piston
- ▶ Défaut protège aiguille
- ▶ Défaut Joint de Piston
- ▶ Défaut particules
- ▶ Défauts Dosage et Fissure

Le contrôle des seringues par les mireuses sont des contrôles à 100%. Cependant, en plus des de ces contrôles automatiques, des prélèvements sont effectués sur lesquels sont réalisés des contrôles visuels des seringues et des tests d'intégrité des seringues. Le but est de démontrer que la seringue remplie et bouchée est complètement hermétique (par le protège aiguille et par le joint de piston) et ainsi que la stérilité est conservée pendant l'étape de mirage.

Le mirage étant une étape d'identification et d'éjection des défauts, il est primordial de contrôler les performances du mirage en particulier d'un point de vue qualité. Pour cela un contrôle est réalisé par du personnel compétent (le laboratoire de contrôle qualité conditionnement) selon un plan d'échantillonnage déterminé par la norme ISO 28-59-1. Le nombre de seringues contrôlées est basé sur le nombre de seringues par lot et sur le niveau de NQA (niveau de qualité acceptable) que l'on souhaite lui appliquer. Ce niveau de NQA peut être modifié en cours d'années en fonction des résultats des contrôles réalisés.

IV. CONDITIONNEMENT ET DISTRIBUTION DU VACCIN

IV.1 ETAPES DE CONDITIONNEMENT

IV.1.1 Définition du conditionnement

En sortie de mirage, la seringue est dite « nue », c'est-à-dire qu'il s'agit d'une seringue remplie de suspension de vaccin comprenant un joint de piston et un protège aiguille. A cette étape, la seringue est dans son conditionnement primaire. (« Le conditionnement primaire est celui en contact avec le médicament »²⁵)

L'étape appelée « conditionnement » consiste à ajouter au médicament un conditionnement secondaire et tertiaire permettant son utilisation, son identification et son transport sans risque de l'abîmer. Il s'agit donc d'ajouter à la seringue : une étiquette, une tige piston, une notice d'utilisation et de l'insérer dans un étui puis de mettre les étuis dans une caisse.

Sur le conditionnement primaire ou secondaire doivent obligatoirement apparaître : la DCI (Dénomination Commune Internationale), la forme pharmaceutique, le numéro de lot et la date de péremption. Ces mentions obligatoires sont prévues par le code de la Santé Publique : Article R5121-138.

Sur le conditionnement secondaire doivent figurer les mentions obligatoires minimales, la notice insérée dans la boîte concentrant l'information utile aux patients telle qu'autorisée par les autorités de santé. La maquette de la boîte doit d'ailleurs être approuvée par les autorités réglementaires.

Cette étape de conditionnement est une étape essentielle pour la distribution, la dispensation et l'administration du produit au patient. Elle permet d'obtenir la spécialité sous sa forme définitive.

Les articles de conditionnement

✓ Etiquette Seringue :

L'étiquette seringue est directement apposée sur la seringue nue remplie et mirée. Elle renseigne l'utilisateur sur l'identité du produit et son dosage. Y sont également inscrites les mentions repiquées : numéro de lot, date de péremption et parfois la date de fabrication (en fonction des autorités réglementaires des pays auxquels le produit est destiné).

✓ Notice :

La notice doit comporter toutes les informations utiles à l'utilisation du produit (indications, contre-indications, posologie, effets secondaires, interactions, condition de conservation).

✓ Etui :

L'étui permettra l'identification de la spécialité lors du premier contact du client final avec celui-ci. Il doit comporter le nom du produit et son dosage. Sont également imprimées les mentions repiquées : n° de lot, date de péremption et parfois date de fabrication (selon les dispositions légales du pays).

✓ Etiquette boîte groupe ou caisse :

La boîte groupe ou caisse contient les produits finis conditionnés. Elle possède une étiquette pour identification du produit contenu. Y sont également inscrites les mentions repiquées : numéro de lot, date de péremption, condition de conservation et parfois la date de fabrication.

IV.1.2 Les étapes du conditionnement

1) Pose TP/assemblage/étiquetage

La première étape consiste à introduire une tige piston dans la seringue. Elle peut être clipsée ou vissée selon le modèle de piston introduit dans la seringue.

Un système de contrôle (capteur/caméra) s'assure de la présence et du bon clipsage/vissage de la tige piston.

A la sortie de l'étape précédente est apposée l'étiquette seringue. Elle est déposée grâce au déroulement d'une bande d'étiquette. Les mentions variables sont vérifiées par un système de vision (caméra permettant de s'assurer que les mentions sont bien lisibles par tous et correctes par rapport aux données entrées dans le pupitre).

Les seringues considérées comme non conformes par les systèmes de vision sont éjectées dans un bac spécifique et seront recontrôlées par une personne habilitée à définir si les seringues sont conformes ou non.

2) La mise en blister

Au niveau de l'équipement appelé thermoformeuse, plusieurs fonctions sont mises en jeu. Une bande de PVC est chauffée entre deux plaques puis moulée en un ou plusieurs blisters non operculés. Un système de distribution ou de préhension permet de disposer les seringues une à une dans les blisters. Il va en effet y avoir thermoformage de la coque du blister, dépose de la seringue dans celle-ci, scellage du blister avec du pelable puis prédécoupe et/ou découpe du blister.

C'est à ce moment que des contrôles d'une grande importance ont lieu. Seront vérifiés : la présence du protège aiguille, de la tige piston, de l'étiquette.

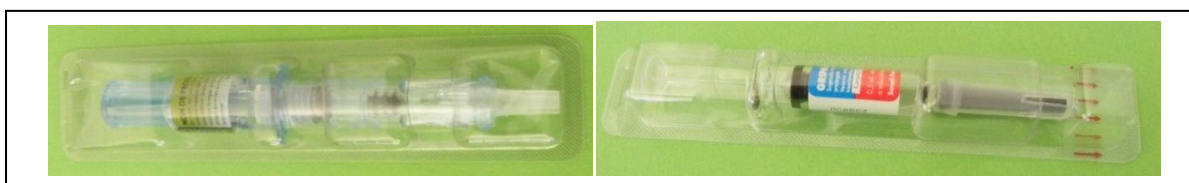


Figure 19: exemple de seringues en blister

3) La mise en étui

C'est l'encartonneuse qui va permettre d'une part de remplir l'étui avec le/les blister(s) et la notice et d'autre part fermer l'étui.

Un magasin distribue les étuis qui seront mis en forme par l'encartonneuse. Les blisters y sont insérés avec la notice (souvent en une seule étape). Il y a enfin fermeture de l'étui grâce au rabattage des pattes de l'étui puis insertion du rabat dans celui-ci.

Un système de contrôle (lecteur du code étui) au niveau du magasin est nécessaire afin de vérifier que le code barre de l'étui avant insertion des blisters est celui du lot concerné.

Les étuis passent par une trieuse pondérale avant l'acheminement jusqu'à la vignetteuse ce qui permet de détecter le manque éventuel de notice, de blister ou de seringue. Les étuis non conformes sont éjectés avant la vignetteuse. Cette trieuse pondérale peut aussi être positionnée en sortie de vignetteuse avant l'acheminement jusqu'à l'encaisseuse.



Figure 20:exemples de présentation de vaccins contre la grippe saisonnière

4) La pose vignette

Aujourd'hui, les vignettes n'apparaissent plus sur les médicaments. Envisagée dès 1999 pour simplifier les circuits de facturation et de paiement des ordonnances, la suppression de la vignette pharmaceutique a été décidée à la fin de l'année 2012, sur la base d'un rapport de l'Inspection générale des affaires sociales (IGAS).

Ces vignettes, qui indiquaient les prix et les conditions de remboursement, ne figurent plus sur les boîtes des médicaments et sont remplacées par un code de traçabilité en deux dimensions le "**Datamatrix**" qui renforce la sécurité, la qualité et la traçabilité de la chaîne du médicament auprès des différents professionnels. Cette suppression permet ainsi de moderniser, sécuriser et fluidifier les circuits de distribution et de remboursement des médicaments. En outre, il va très prochainement être possible de scanner le Datamatrix pour avoir un accès direct sur le site www.medicaments.gouv.fr via son smartphone.



Figure 21: Exemple de datamatrix

C'est au niveau de la vignetteuse que se fait l'impression des mentions repiquées sur l'étui. On y retrouve : le numéro de lot, la date de péremption, la date de fabrication et le Datamatrix.

Un système de contrôle (caméra) vérifie la présence des mentions repiquées sur l'étui. Les étuis imprimés sont acheminés vers l'encaisseuse et les étuis défectueux sont éjectés puis contrôlés manuellement puis recyclés si nécessaire.

5) La mise en caisse

Les étuis sont accumulés en fin de convoyeur pour être poussés dans une boîte groupe ou caisse. Il existe deux types d'encaisseur :

- **manuel** : l'encaisseuse forme des fardeaux et l'opérateur met les fardeaux dans les boîtes groupes sur lesquelles sont déposées des étiquettes préalablement imprimées. Il vient fermer la boîte et la déposer sur une palette selon le plan de palettisation adéquat.
- **automatique** : la machine est alimentée en caisses, les étuis sont introduits par étage dans ces caisses puis il y a fermeture automatique par scotchage de celles-ci puis impression et dépose de l'étiquette caisse

Sur ce deuxième système, une vision permet de vérifier que tous les étuis sont présents dans la caisse. En cas de non-conformité, les caisses sont éjectées et contrôlées manuellement.

6) Palettiseur

Le palettiseur automatique est utilisé pour le deuxième type d'encaisseuse. En effet, un programme est intégré directement dans le palettiseur qui va disposer les caisses étiquetées selon le plan de palettisation défini pour le produit. La palette peut alors être filmée par le palettiseur et entreposée au réfrigérateur.

IV.1.3 Les contrôles effectués au conditionnement

Au cours du conditionnement, de nombreux contrôles en cours de procédés sont réalisés : casse collerette, vérification des mentions repiquées sur la seringue ou sur l'étui, la présence de la tige piston, du protège aiguille, l'éjection des produits défectueux...

Plusieurs prélèvements sont réalisés et leur nombre dépend de la taille du lot (selon la norme ISO 2859-1)²⁶. Les essais réalisés sont :

- le test des volumes extractibles ce qui permet de vérifier le volume de remplissage des seringues avant expédition. Ce volume doit être compris dans un intervalle défini au préalable dans les procédures de remplissage²⁷.

- le « contrôle à réception » : ce contrôle sert notamment lorsque le vaccin est conditionné par un sous-traitant. Il permet au client de vérifier l'état général de l'étui (extérieur et intérieur), du blister, de la notice et de la seringue ainsi que les mentions inscrites sur les différents articles. Sont notamment vérifiés : le numéro de lot, la date d'expiration et la date de fabrication.

Enfin des étuis sont gardés pour archive.

IV.2 CONDITIONS DE TEMPERATURE DU VACCIN

Le vaccin contre la grippe est un produit qui doit être conservé entre 2° et 8° C en dehors des étapes de fabrication pendant lesquelles la température est suivie et tracée. Il est impératif de maintenir le vaccin entre 2° et 8°C pendant les différentes étapes de stockage ainsi que pendant la distribution de celui-ci. Le vaccin ne doit pas subir d'excursion au-delà de 25°C et ne doit pas être congelé ce qui entrainerait une baisse de son efficacité voir une inactivation totale du vaccin. Il est donc primordial d'avoir un suivi des températures que ce soit pendant la fabrication ou pendant le ou les transports.

La traçabilité de la température des produits pharmaceutiques et de l'ensemble des articles entrant dans sa production constitue une obligation réglementaire. Elle ne s'applique pas uniquement à la production, mais aussi au stockage, qui ne peut se faire que dans des locaux ayant reçu l'agrément des autorités, et au transport, durant lequel le produit reste sous la responsabilité du fabricant. Egalement, il incombe au fabricant de connaître la localisation et donc les destinataires de chaque lot, afin de pouvoir procéder à un éventuel retrait d'un produit en cas de problème.

Le stockage des cuves ou des produits finis s'effectue en chambre froide dont la température est constamment suivie et dont l'entretien est fait régulièrement. Ces cuves et palettes sont clairement identifiées et sont référencées informatiquement afin de faciliter la sortie des produits lors du chargement des camions. Différents systèmes de contrôles de température sont mis en place afin de tracer les températures auxquelles le vaccin a été confronté pendant sa fabrication et pendant les transports jusqu'à leur arrivée à la pharmacie ou dans les hôpitaux.

- le suivi du temps hors réfrigération : pendant la production, pour chaque étape est noté la durée pendant laquelle les cuves ou seringues étaient hors de la chambre froide.

- des dispositifs de contrôle de température sont installés sur les palettes de produits ou sur les cuves de suspension vrac pour tracer les températures auxquelles le produit a été exposé pendant les transports. Les « *temp tales* » permettent d'effectuer cette traçabilité. Les données de ces systèmes sont extraites et exploitées, pour tracer la courbe de température qu'ont subie les produits.



Figure 22: illustration d'un temp tale pour le suivi des températures

Le transport des médicaments s'effectue par camions réfrigérés ou par containers réfrigérés pour transport par bateau ou avion.

IV.3 LIBERATION PHARMACEUTIQUE

Une spécialité pharmaceutique doit répondre à trois exigences fondamentales : qualité, efficacité, sécurité. Pour en assurer la qualité, elle ne peut être mise en circulation qu'à l'issue de contrôles de la qualité portant sur toute la production et sur les tests effectués sur échantillons par les laboratoires. Le résultat de ces contrôles fait partie du « dossier de lot ».

Tous les documents signés au cours de la fabrication apparaissent également dans ce dossier de lot : les certificats de contrôle des matières premières, les données de l'environnement de production (conformité physico-chimique et microbiologique), les « données brutes » comme les tickets de pesées pour la fabrication, le conditionnement ou la distribution du lot.

Dans le dossier de lot, sont décrites les instructions de fabrication, de conditionnement et de distribution de la spécialité pharmaceutique. Toute anomalie y est répertoriée et toute action y est enregistrée. C'est le pharmacien responsable ou son délégué qui est responsable de la libération du lot

Plus généralement, toute installation de production de médicaments ne peut fonctionner qu'avec l'aval des autorités de santé, autorisation renouvelée en principe tous les deux ans, et à chaque fois qu'intervient un changement. Cette étroite surveillance, dont le but est de protéger le patient, assure que le médicament est produit avec un niveau de qualité adaptée et reproductible, répondant à des critères précis, dans le cadre d'une procédure validée, reproductible dans un même environnement contrôlé par des personnes spécifiquement formées.

V. INNOVATION ET AVENIR

V.1 INNOVATIONS SUR LA FORMULATION :

2 SOUCHES B

Chaque hiver, les souches destinées à la formulation des vaccins antigrippaux saisonniers dont il est attendu qu'elles circulent lors de la prochaine saison grippale de l'hémisphère nord sont sélectionnées. Jusqu'en 1978, les vaccins contre la grippe saisonnière aux Etats-Unis contenaient uniquement deux souches (une souche de la grippe A et une souche de la grippe B). Puis, il a été décidé d'inclure une deuxième souche de la grippe A afin d'améliorer la protection contre les deux types de virus qui co-circulaient. Ces 35 dernières années, les vaccins contre la grippe étaient trivalents et permettaient de garantir une protection contre trois souches de virus de la grippe : deux sous-types de virus de la grippe A (H1N1 et H3N2) et un virus de la grippe B. Toutefois, depuis la saison 2001-2002, deux types de virus de la grippe B (issus respectivement des lignées Victoria et Yamagata) co-circulent avec une prévalence variable, ce qui rend difficile de prédire quelle sera la lignée d'appartenance de la souche B qui prédominera au cours de la saison suivante.

Ainsi en 2013, la FDA américaine et l'EMA autorise la mise sur le marché de nouveaux vaccins quadrivalents contre la grippe saisonnière pour utilisation pédiatrique et adulte. Le nouveau vaccin comprend toujours 2 souches de type A mais ne contient plus une mais deux souches de type B.

La grippe B est une cause de morbidité et de mortalité chez les enfants atteints de la grippe et a été associée à la pneumonie et à d'autres maladies respiratoires ainsi qu'à des maladies du système nerveux, des douleurs musculaires et des inflammations, mais peut être aussi à l'origine d'autres complications. Au cours des dernières années, des décès liés à la grippe chez les jeunes enfants et adolescents âgés de moins de 18 ans ont été provoqués par la grippe de type B. Des études d'efficacité du vaccin sont encore en cours sur ce nouveau vaccin quadrivalent. Le facteur géographique est un facteur important à prendre en compte car selon la zone les souches B circulantes ne sont pas les mêmes. Les vaccins trivalents et quadrivalents vont donc coexister pour les prochaines saisons vaccinales.

V.2 INNOVATION SUR LA FORME DU VACCIN : INJECTION INTRADERMIQUE ET INTRANASALE

Voie intradermique (FluID/FluzoneID) :

Les vaccins contre la grippe sont généralement administrés aux adultes en intramusculaire (IM) avec une aiguille de 25 à 40 mm. La vaccination par voie intradermique (ID) introduit le vaccin dans le derme de la peau avec une aiguille ultra-mince de seulement 1,5 mm de longueur, soit moins d'un dixième de la longueur des aiguilles habituelles. Mais le volume d'injection est de 0,1 mL, soit un cinquième de la quantité injectée lorsque le vaccin est administré en intramusculaire, c'est le principal avantage de cette innovation.

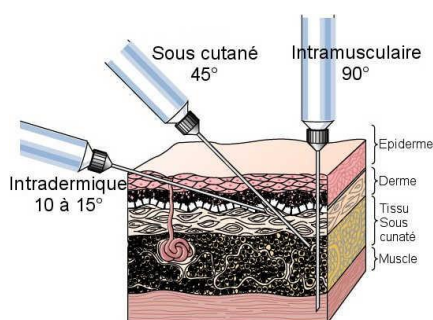


Figure 23: illustration des types d'injection



Figure 24: illustration de la taille de l'aiguille intradermique

Le système de micro-injection a été conçu pour déposer suffisamment d'antigènes le derme des adultes sans distinction de sexe, d'âge, d'ethnie ou de masse corporelle. L'injection intradermique est dosée à 9 μg (15-59ans) et 15 μg (≥ 60 ans) et l'injection intramusculaire 15 μg mais le derme présente une concentration élevée de cellules immunitaires spécialisées, appelées cellules dendritiques, qui jouent un rôle déterminant dans le déclenchement de la réponse immunitaire. Ce nouveau système d'injection intradermique du vaccin contre la grippe saisonnière a été homologué par l'EMA en 2008 et par la FDA en 2011.

Selon une étude menée par les Groupe Régionaux d'Observation de la Grippe (GROG), le vaccin intradermique s'est révélé aussi efficace que le vaccin intramusculaire malgré le faible volume d'injection. En revanche, le bénéfice à long terme a été jugé modeste à cause des réactions locales rendues plus visibles par l'intradermique. La tolérance paraît moins bonne au fur et à mesure des injections.²⁸

Voie intranasale (Fluenz®) :

Le vaccin intranasal est constitué des mêmes souches de virus que le vaccin administré par voie injectable ; il s'agit d'un *vaccin grippal vivant atténué*.



Figure 25: mode d'administration intranasal

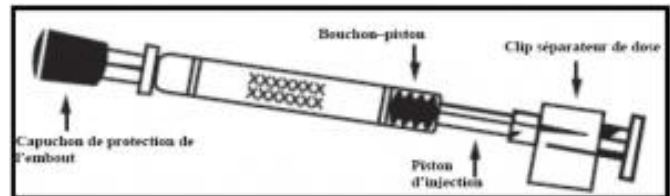


Figure 26: dispositif intranasal

Chacun des virus, est adapté au froid, c'est-à-dire que ces souches ont la capacité de se multiplier localement au niveau du nasopharynx à une température inférieure à celle du nasopharynx soit 25°C à 33°C suivant la température de l'air inhalé. De plus, ces virus sont thermosensibles, limitant de fait leur niveau de répliation au niveau du tractus respiratoire inférieur pour réduire le risque de transmission d'un individu à l'autre. Il agit sur l'immunité muqueuse en provoquant des réactions proches de celles engendrées par la maladie naturelle.

Les résultats des études d'efficacité sont divergents. Ce vaccin a obtenu son AMM en 2011 et est recommandé aux enfants de 24 mois à 17 ans en primo vaccination grippale et d'autant plus que le sujet est jeune.

V.3 INNOVATION SUR LE CONDITIONNEMENT

Les vaccins à usage humain sont classiquement conditionnés en blister accompagné d'une notice insérée dans un étui.

Aujourd'hui, les industriels de la santé et notamment du vaccin contre la grippe saisonnière proposent d'autres conditionnements. En effet, étant donné que les pouvoirs publics mettent en place des campagnes de préventions contre la grippe (vaccination), il faut s'adapter aux structures accueillant les vaccinations de masse. C'est le cas par exemple des hôpitaux, des cabinets médicaux ou même des structures mobiles pour la campagne hivernale.

Plusieurs nouveautés s'offrent au marché du vaccin grippal, par exemple un conditionnement qui se présente sous la forme d'un étui dans lequel sont rangés deux blisters de 5 seringues chacun avec une notice et les étiquettes permettant d'assurer la traçabilité de la vaccination le vaccin dans le carnet de santé. Cette présentation permet un gain de place pour les centres de stockage ainsi qu'une diminution du coût des frais de transport. En effet, le volume à transporter et les déchets générés sont réduits.

Un autre conditionnement est arrivé sur le marché, il s'agit d'une présentation dans un emballage entièrement en carton. Les seringues sont déposées dans un chevalet formé avec du carton dans lequel sont superposées deux couches de 5 seringues. Le gain ici est écologique mais aussi économique. Aucune matière plastique n'est utilisée, ainsi, un gain de volume de 2/3 est obtenu avec un étui de 10 seringues sans blister par rapport à un conditionnement 10 étuis de 1 seringue avec blister.

CONCLUSION

Depuis son développement dans les années 30, le vaccin contre la grippe saisonnière fabriqué à partir d'œufs de poule embryonnés, a fait l'objet de très peu de modifications du procédé de fabrication. Ce procédé de fabrication est validé et a prouvé son efficacité.

Le vaccin contre la grippe saisonnière fait toujours l'objet de recherche pour améliorer son efficacité ou moderniser son procédé de fabrication (vu précédemment).

Aujourd'hui, le risque principal pour la santé publique est la pandémie grippale. En effet, les virus grippaux de type A peuvent aussi être à l'origine de pandémies mondiales. Celles-ci sont caractérisées par une dissémination rapide de nouveaux sous-types grippaux A (ou souche de sous-type) capable de se transmettre d'homme à homme et suffisamment différents sur la plan antigénique des virus en circulation pour échapper aux défenses immunitaires spécifiquement constituée contre la souche dans la population.

Enregistrées depuis le milieu du XVIIIème siècle, les grandes pandémies historiques, celle de « grippe espagnole » survenue en 1918 a été la plus sévère causant 20 à 40 millions de morts voire plus, selon les estimations, dans l'ensemble du monde. Des pandémies moins sévères sont apparues en 1957 (« grippe asiatique ») et en 1968 (« grippe de Hong Kong »). En 2009, des flambées d'ampleur mondiale dues à une souche A(H1N1) appelée A(H1N1)pdm09 ont atteint des proportions pandémiques, même si elle a évolué progressivement par la suite en 2010 vers un schéma saisonnier.

Le rôle des Industries Pharmaceutiques fabricant le vaccin contre la grippe saisonnière est de pouvoir adapter leurs locaux à la fabrication éventuelle d'un vaccin pandémique pour répondre au plus vite à ce problème de santé publique. La fabrication du vaccin par biotechnologie peut aussi être un moyen d'être présent plus rapidement sur le marché en cas de pandémie grippale.

LISTE DES FIGURES UTILISEES

Figure 1 :	Structure schématique d'un virus Influenza A	p 12
Figure 2 :	Cycle cellulaire de réplication du virus de la grippe	p 14
Figure 3 :	extrait du journal officiel de la commission Européenne	p 20
Figure 4 :	Schéma de la structure d'un virosome	p 23
Figure 5 :	Action des anticorps neutralisants après vaccination	p 24
Figure 6 :	illustration de l'inoculation des œufs	p 32
Figure 7 :	Schéma de production de monovalents faite sur œufs	p 32
Figure 8 :	Schéma de la production de monovalents faite sur des cellules	p 33
Figure 9 :	Diagramme d'Ishikawa	p 36
Figure 10 :	exemple de "boîte à gant" pour remplissage aseptique	p 37
Figure 11 :	exemple de tenue destinée à la zone à atmosphère contrôlée de type B ou C	p 38
Figure 12 :	exemples de matériel utilisé pour le remplissage aseptique	p 39
Figure 13 :	exemple d'autoclave	p 40
Figure 14 :	système qui permet le remplissage aseptique des seringues	p 41
Figure 15 :	exemple de seringues utilisées pour la fabrication du vaccin contre la grippe saisonnière	p 41
Figure 16 :	Schéma de l'environnement de remplissage	p 42
Figure 17 :	exemple de boîte à gant permettant le retrait des sachets des composants stériles	p 42
Figure 18 :	Logigramme du procédé de mirage	p 44
Figure 19 :	Exemple de seringues en blister	p 48
Figure 20 :	Exemples de présentation de vaccins contre la grippe saisonnière	p 49
Figure 21 :	Exemple de Datamatrix	P 49
Figure 22 :	Illustration d'un temp tale pour le suivi de température	p 52

Figure 23 :	illustration des types d'injection	p 55
Figure 24 :	illustration de la taille de l'aiguille intradermique	p 55
Figure 25 :	mode d'administration intranasal	p 56
Figure 26 :	dispositif intranasal	p 56

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ARN	:	Acide RiboNucléique
HA	:	Hémagglutinine
NA	:	Neuraminidase
INVS	:	Institut National de Veille Sanitaire
CDC	:	Center for Disease Research
CRRI	:	Center for Reference and Research on Influenza
NIH	:	National Institute of Health
NIMR	:	National Institute for Medicinal Research
EMA	:	Agence Européenne pour l'Évaluation des Médicaments
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
NIBSC	:	National Institute for Biological Standard and Control
CHMP	:	Comittee for Medicinal Products for Human use
CSP	:	Comité des Spécialités Pharmaceutiques
AMM	:	Autorisation de mise sur le Marché
CEE	:	Communauté Economique Européenne
GFRM	:	Groupe de Facilitation de Reconnaissance Mutuelle
ANSM	:	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
DEV	:	Direction de l'Évaluation
DLC	:	Direction des Laboratoires et des Contrôles
CBER	:	Center for Biological Evaluation and Research
CCSL	:	Commonwealth Serum Laboratories
pH	:	Potentiel Hydrogène
CTAB	:	Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide
Eau PPI	:	Pour Préparation Injectable
MDCK	:	Madin Darby Canine Kidney
ZAC	:	Zone à Atmosphère Contrôlée
MFT/TRA	:	Medial Fill Test/ Test de Remplissage Aseptique
BPF	:	Bonnes Pratiques de Fabrication
IPC	:	In process Control
QC	:	Quality control
RNS	:	Rigid Needle Shield
PA	:	Protège Aiguille
AQL	:	Acceptable Quality Limit
PFC	:	Produit Fini Conditionné
PVC	:	Poly Chlorure de Vinyle
TP	:	Tige Piston
FDA	:	Food and Drug Administration
ID	:	Intra Dermique
IM	:	Intra Musculaire
GROG	:	Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe

BIBLIOGRAPHIE

¹ Définition de la grippe selon Wikipédia

² Nombre de victimes selon le site de l'institut Pasteur

³ <http://www.sante.gouv.fr/la-grippe.html>

⁴ Médecine thérapeutique. Volume 16, Numéro 4, 357-73, octobre-novembre-décembre 2010, Revue

⁵ http://www.jle.com/fr/revues/met/edocs/grippe_vaccination_prophylaxie_et_traitement_par_les_antiviraux_287383/article.phtml?tab=texte

⁶ http://www.jle.com/fr/revues/met/edocs/grippe_vaccination_prophylaxie_et_traitement_par_les_antiviraux_287383/article.phtml

⁷ Virologie. Volume 3, Numéro 4, 323-8 Juillet-Août 1999, Revue

⁸ CPMP/EWP/463/97 : committee for medicinal products for human use CHMP

⁹ Communication de la Commission — Lignes directrices concernant les caractéristiques des différentes catégories de modifications des termes d'une autorisation de mise sur le marché pour des médicaments à usage humain et des médicaments vétérinaires. 24 novembre 2008 (2010/C 17/01)

¹⁰ Pharmacopée européenne 8^{ème} édition : p860-871

¹¹ Structure d'un virosome. 2005 Berna Biotech AG

¹² Médecine thérapeutique. Volume 16, Numéro 4, 357-73, octobre-novembre-décembre 2010, Revue

¹³13 Pharmacopée Européenne 8^{ème} édition: chapitre : « préparations parentérales »

¹⁴ Pharmacopée Européenne 8.2 édition 2014 : eau pour préparation injectable

¹⁵ Extrait du livre : virologie médicale générale p135/136

¹⁶ http://www.acadpharm.org/dos_public/PalmarEs_2013_VF_2013.12.17_LM_2.pdf

¹⁷ Schéma provenant du site de l'ANSM : <http://ansm.sante.fr/Dossiers-thematiques/Pandemie-grippale/Evaluation-et-production-des-vaccins-pandemiques>

¹⁸ Thèse de Audrey Anne Le Ru : « production du virus influenza dans des cellules hek-293 cultivées en suspension »

¹⁹ Schéma provenant du site de l'ANSM : <http://ansm.sante.fr/Dossiers-thematiques/Pandemie-grippale/Evaluation-et-production-des-vaccins-pandemiques>

²⁰ Selon la Pharmacopée Européenne 8^{ème} édition : immunoserum d'origine animale pour usage humain

²¹ SYLVIE VANDRIESSCHE, Aspec : dossier : « Milieu, matières, matériels, méthodes : audits menés en industrie

²² Pharmacopée Européenne 8^{ème} édition : Chapitre 5.1.1 Méthode de préparation des produits stériles

²³ Schéma extrait de la formation théorique/vaccin/remplissage 2013 Sanofi Le Trait

²⁴ Bonnes pratiques de fabrication 2011/8 point N°124 (dernières étapes de fabrication)

²⁵ <http://www.sante.gouv.fr/etiquetage-et-informations-sur-le-medicament-specialite-pharmaceutique.html>

²⁶ ISO 2859-1:1999

Règles d'échantillonnage pour les contrôles par attributs -- Partie 1: Procédures d'échantillonnage pour les contrôles lot par lot, indexés d'après le niveau de qualité acceptable (NQA)

²⁷ Pharmacopée Européenne : 2.9.17 : Essai du volume extractible pour les préparations parentérales

²⁸ Pr Odile Launay INNOVATIONS EN MATIERE DE VACCIN ANTIGRIPPAL CIC de vaccinologie Cochin Pasteur Hôpital Cochin, Paris

**ANNEXE 1 : Monographie des vaccins à usage
Humain**

Les exigences ci-dessus ne s'appliquent pas aux produits biologiques ou biotechnologiques, aux oligonucléotides, aux produits radiopharmaceutiques, aux produits de fermentation et produits hémisynthétiques dérivés, aux produits bruts d'origine animale ou végétale ou aux produits végétaux.

Pour les substances actives dans une nouvelle demande d'enregistrement d'un médicament à usage humain, les exigences des lignes directrices sur les limites des impuretés génotoxiques et les documents de Questions/Réponses correspondants publiés sur le site Internet de l'Agence européenne des médicaments (ou des principes d'évaluation semblables pour les États non membres de l'Union Européenne) doivent être respectés.

Solvants résiduels. La teneur en solvants résiduels est limitée selon les principes définis dans le chapitre 5.4, par la méthode générale 2.4.24 ou une autre méthode appropriée. Si une détermination quantitative d'un solvant résiduel est effectuée et qu'un essai de perte à la dessiccation n'est pas effectué, il est tenu compte de la teneur en solvant résiduel dans le calcul de la teneur lors du dosage de la substance et dans celui du pouvoir rotatoire spécifique et de l'absorbance spécifique.

Qualité microbiologique. Les monographies spécifiques présentent des critères d'acceptation de la qualité microbiologique lorsqu'un tel contrôle est nécessaire. Le tableau 5.1.4.-2. – *Critères d'acceptation de la qualité microbiologique des substances pour usage pharmaceutique non stériles* du chapitre 5.1.4. *Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles* présente des recommandations quant à la qualité microbiologique qui sont d'une application générale pour les substances sujettes à contamination microbienne. En fonction de la nature de la substance et de l'utilisation à laquelle elle est destinée, des critères d'acceptation différents peuvent être justifiés.

Stérilité (2.6.1). Les substances pour usage pharmaceutique destinées à la préparation de formes stériles sans autre procédé approprié de stérilisation, ou présentées comme substances de qualité « stérile », satisfont à l'essai de stérilité.

Endotoxines bactériennes (2.6.14). Les substances pour usage pharmaceutique présentées comme substances de qualité « exempte d'endotoxines bactériennes » satisfont à l'essai des endotoxines bactériennes. La limite et la méthode d'essai à utiliser (s'il ne s'agit pas de la méthode A de gélicification) sont indiquées dans la monographie de la substance. La limite est calculée selon le chapitre général 5.1.10. *Recommandations pour la réalisation de l'essai des endotoxines bactériennes*, sauf si une limite inférieure est justifiée au vu des résultats obtenus sur les lots de production, ou est exigée par l'Autorité compétente. Lorsqu'un essai des endotoxines bactériennes est prescrit, il n'est pas exigé d'essai des pyrogènes.

Pyrogènes (2.6.8). Les substances pour usage pharmaceutique pour lesquelles il est justifié d'utiliser l'essai des pyrogènes plutôt que celui des endotoxines bactériennes et qui sont présentées comme substances de qualité « exempte de pyrogènes », satisfont à l'essai des pyrogènes. La limite et la méthode d'essai à utiliser sont indiquées dans la monographie de la substance, ou approuvées par l'Autorité compétente. Sous réserve de validation comparative appropriée, l'essai des endotoxines bactériennes peut remplacer celui des pyrogènes.

Propriétés supplémentaires. Le contrôle de propriétés particulières (caractéristiques physiques, caractéristiques liées à la fonctionnalité, par exemple) peut être nécessaire pour certains procédés de fabrication ou certaines formulations. Des qualités spéciales d'une substance (stérile, exempte d'endotoxines, apyrogène, etc.) peuvent être produites en vue de la fabrication de préparations pour administration parentérale ou d'autres formes pharmaceutiques, et des exigences appropriées peuvent alors être spécifiées dans la monographie de la substance.

DOSAGE

Sauf exception justifiée et autorisée, les teneurs en substances pour usage pharmaceutique sont déterminées au moyen de méthodes appropriées.

ÉTIQUETAGE

D'une manière générale, l'étiquetage est régi par des accords internationaux et par des règlements supranationaux et nationaux. Les indications figurant sous la rubrique *Étiquetage* ne constituent donc pas une liste exhaustive et, par ailleurs, seules sont obligatoires aux fins de la Pharmacopée, les indications d'étiquetage nécessaires pour démontrer la conformité ou non-conformité à la monographie. Toute autre information est donnée à titre de recommandation. Lorsque le terme « étiquette » est employé dans la Pharmacopée, les indications peuvent figurer sur le récipient, sur l'emballage, sur une notice jointe à l'emballage, sur le certificat d'analyse qui accompagne le produit, selon la décision de l'Autorité compétente.

Dans les cas appropriés, l'étiquette indique que la substance :

- est destinée à un usage spécifique,
- présente une forme cristalline distincte,
- possède un degré de finesse spécifique,
- a fait l'objet d'un compactage,
- a fait l'objet d'un enrobage,
- a fait l'objet d'une granulation,
- est stérile,
- est exempte d'endotoxines bactériennes,
- est apyrogène,
- contient des agents régulateurs d'écoulement.

Dans les cas appropriés, l'étiquette indique :

- le degré d'hydratation,
- le nom et la concentration de tout excipient.

01/2013:0153

VACCINS POUR USAGE HUMAIN

Vaccina ad usum humanum

DÉFINITION

Les vaccins pour usage humain sont des préparations contenant des antigènes ayant la propriété de créer chez l'homme une immunité active et spécifique contre l'agent infectant ou la toxine ou l'antigène élaborés par celui-ci. Les réponses immunitaires comprennent l'induction des mécanismes innés et adaptifs (cellulaires, humoraux) du système immunitaire. Il doit être démontré que les vaccins à usage humain possèdent une activité immunogène et une innocuité acceptables chez l'homme lorsqu'ils sont administrés selon le programme de vaccination préconisé.

Les vaccins pour usage humain peuvent être constitués par : des microorganismes entiers (bactéries, virus ou parasites), inactivés par des moyens chimiques ou physiques qui maintiennent des propriétés immunogènes adéquates ; des microorganismes vivants entiers naturellement avirulents ou qui ont été traités afin d'atténuer leur virulence tout en maintenant des propriétés immunogènes adéquates ; des antigènes extraits des microorganismes ou sécrétés par des microorganismes ou préparés par génie génétique ou synthèse chimique. Les antigènes peuvent être utilisés dans leur état d'origine ou ils peuvent être détectés ou modifiés de toute autre manière, par des moyens chimiques ou physiques et peuvent être sous forme d'agrégats, de conjugués ou de polymères afin d'augmenter leur pouvoir immunogène. Les vaccins peuvent contenir un adjuvant. Si l'antigène est adsorbé sur un adjuvant minéral, le vaccin est appelé vaccin « adsorbé ».

Certains termes employés dans les monographies des vaccins pour usage humain sont définis dans le chapitre 5.2.1.

Les *vaccins bactériens contenant des cellules entières* sont des suspensions d'opacité variable dans des liquides incolores ou sensiblement incolores ou ils peuvent être cryodesséchés. Ils peuvent être adsorbés. La concentration en bactéries vivantes ou inactivées est exprimée en Unités Internationales d'opacité, ou selon le cas, par dénombrement des germes dans une cellule compte-microbes ou pour les germes vivants, par culture.

Les *vaccins bactériens contenant des composants de bactérie* sont des suspensions ou des produits cryodesséchés. Ils peuvent être adsorbés. La teneur en antigène est déterminée par un dosage approprié valide.

Les *anatoxines bactériennes* sont préparées à partir de toxines par réduction de leur toxicité à un niveau acceptable ou par neutralisation complète de cette toxicité au moyen de méthodes physiques ou chimiques, tout en maintenant des propriétés immunogènes adéquates. Les toxines sont obtenues à partir de souches sélectionnées de microorganismes. La méthode de préparation est choisie de façon à transformer de manière irréversible la toxine en anatoxine. Les anatoxines sont purifiées. La purification est effectuée avant et/ou après détoxification. Les vaccins anatoxiques peuvent être adsorbés.

Les *vaccins viraux* sont préparés à partir de virus cultivés soit sur animaux ou sur oeufs embryonnés, soit sur cultures cellulaires ou sur tissus appropriés, soit par la culture de cellules modifiées par génie génétique. Les vaccins viraux sont liquides et peuvent être d'opacité variable selon le type de préparation ou ils peuvent être cryodesséchés. Ils peuvent être adsorbés. Les préparations liquides et les préparations cryodesséchées reconstituées peuvent être colorées lorsqu'un indicateur de pH tel que le rouge de phénol a été utilisé dans le milieu de culture.

Les *vaccins à antigène de synthèse* sont généralement des liquides limpides ou incolores. La concentration des composants est habituellement exprimée par une teneur en antigène spécifique.

Les *vaccins combinés* sont des préparations ayant plusieurs composants et formulées de telle façon que plusieurs antigènes sont administrés simultanément. Les différents composants antigéniques sont destinés à protéger contre différents types ou souches d'un même organisme et/ou contre différents organismes. Un vaccin combiné peut être présenté par le fabricant soit sous forme d'une préparation unique liquide ou cryodesséchée soit sous forme de plusieurs constituants accompagnés des indications nécessaires pour le mélange avant emploi. Lorsqu'il n'existe aucune monographie pour une combinaison particulière, le vaccin est conforme à la monographie de chaque composant individuel, avec les modifications éventuellement approuvées par l'Autorité compétente.

Les *vaccins adsorbés* sont des suspensions ; ils peuvent laisser un dépôt au fond du récipient.

PRODUCTION

Dispositions générales. Il doit être établi que le procédé de production utilisé pour un produit donné permet d'obtenir de façon constante des lots comparables à celui pour lequel l'efficacité clinique, le pouvoir immunogène et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées. Les spécifications du produit, y compris les contrôles en cours de fabrication, doivent être établies. Des exigences spécifiques concernant la production, y compris les essais effectués en cours de fabrication figurent dans les monographies spécifiques. Dans des cas justifiés et autorisés, certains essais peuvent ne pas être effectués s'il peut être démontré par d'autres moyens, par exemple des essais de validation, que le procédé de production donne de façon régulière un produit qui est conforme à l'essai.

Sauf exception justifiée et autorisée, les vaccins sont préparés selon un système de lot de semence. Les méthodes de

préparation sont conçues de façon à conserver les propriétés immunogènes adéquates, à rendre la préparation inoffensive et à prévenir la contamination par des agents étrangers.

Lorsque la fabrication de vaccins pour usage humain fait intervenir des matières d'origine humaine ou animale, les exigences générales du chapitre 5.1.7. *Sécurité virale* s'appliquent en complément des exigences plus spécifiques concernant la sécurité virale qui figurent dans cette monographie ainsi que dans les chapitres 5.2.2. *Élevage de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiques pour la production et le contrôle de qualité des vaccins*, 5.2.3. *Substrats cellulaires utilisés pour la production de vaccins pour usage humain*, 2.6.16. *Essai des agents étrangers dans les vaccins viraux pour usage humain*, et dans les monographies spécifiques.

Sauf exception justifiée et autorisée, pour la production d'un lot final de vaccin, le nombre de passages d'un virus ou le nombre de subcultures d'une bactérie à partir du lot de semence primaire n'est pas supérieur à celui utilisé pour la production du vaccin qui s'est avéré satisfaisant en ce qui concerne l'innocuité et l'efficacité ou le pouvoir immunogène, lors d'essais cliniques.

Dans la mesure du possible, les vaccins sont exempts de substances reconnues comme ayant provoqué des réactions toxiques, des réactions allergiques ou d'autres réactions indésirables chez l'homme. Des additifs convenables, y compris des stabilisants et des adjuvants, peuvent être ajoutés pendant la préparation. La pénicilline et la streptomycine ne sont utilisées à aucun stade de la préparation ni ajoutées dans le produit final ; néanmoins, les lots de semence primaires préparés à l'aide de milieux contenant de la pénicilline ou de la streptomycine peuvent être utilisés pour la production dans des cas justifiés et autorisés.

La régularité de la production est une caractéristique importante de la production des vaccins. Les monographies relatives à des vaccins pour usage humain fournissent des limites concernant différents essais effectués en cours de production et sur le lot final. Ces limites peuvent se présenter sous la forme de valeurs maximales, de valeurs minimales ou de tolérances minimales et maximales autour d'une valeur donnée. Si la conformité à ces limites est requise, elles ne suffisent pas nécessairement à garantir la régularité de la production pour un vaccin donné. Pour disposer d'essais pertinents, le fabricant doit donc définir pour chaque produit un ou plusieurs seuils appropriés d'intervention ou une ou plusieurs limites appropriées pour la libération du produit, à appliquer au vu des résultats obtenus sur des lots testés cliniquement et les lots utilisés pour démontrer la régularité de la production. Ces limites peuvent être affinées ultérieurement sur une base statistique, à la lumière des données de la production.

Substrats pour la multiplication des microorganismes. Les substrats utilisés satisfont aux exigences appropriées de la Pharmacopée (5.2.2, 5.2.3) ou à défaut à celles décidées par l'Autorité compétente. L'utilisation des banques de cellules et des cultures cellulaires qui en sont issues est faite dans des conditions d'asepsie, dans un endroit où d'autres cellules ne sont pas manipulées. Il est démontré que le sérum et la trypsine utilisés dans la préparation des suspensions de cellules et des milieux sont exempts d'agents étrangers.

Lots de semence/banques de cellules. Le lot de semence primaire ou la banque de cellules sont identifiés par des données historiques, y compris des informations sur leur origine et leur manipulation ultérieure. Des mesures appropriées sont prises pour assurer qu'aucun agent étranger, ou toute autre substance indésirable, n'est présent dans un lot de semence primaire ou de travail ou dans une banque de cellules.

Milieux de culture. Les milieux de culture sont exempts, dans la mesure du possible, de substances reconnues comme ayant provoqué des réactions toxiques, des réactions

allergiques ou d'autres réactions indésirables chez l'homme ; s'il est nécessaire d'employer de tels ingrédients pendant la production, il sera démontré que la quantité présente dans le lot final est telle que la préparation est inoffensive. Du sérum animal approuvé (mais non humain) peut être utilisé dans les milieux de culture pour la croissance cellulaire, mais le milieu final utilisé pour maintenir les cultures cellulaires en cours de multiplication virale ne contient pas de sérum animal sauf indication contraire. Les milieux de culture cellulaire peuvent contenir un indicateur de pH tel que le rouge de phénol et des antibiotiques approuvés à la plus faible concentration efficace, mais il est préférable d'utiliser un substrat exempt d'antibiotiques pendant la production.

Multiplication et récolte. La multiplication des cultures de semence et la récolte sont effectuées dans des conditions définies. La pureté de la récolte est vérifiée par des essais appropriés comme définis dans la monographie.

Cellules témoins. Dans les cas de vaccins produits sur cultures cellulaires, des cellules témoins sont maintenues et examinées selon les indications de la monographie. Ces cellules représentent un contrôle valable seulement si elles sont maintenues dans des conditions qui sont équivalentes pour l'essentiel à celles utilisées pour la culture cellulaire de production, y compris l'emploi des mêmes lots de milieux et les mêmes changements de milieu.

Oeufs témoins. Dans les cas de vaccins produits sur oeufs, des oeufs témoins sont maintenus et examinés selon les indications de la monographie.

Purification. Dans les cas appropriés, des procédés de purification validés peuvent être utilisés.

Inactivation. Les vaccins inactivés sont préparés à l'aide d'un procédé d'inactivation validé dont l'efficacité et la régularité ont été démontrées. Lorsqu'il est reconnu que des agents étrangers peuvent être présents dans une récolte, par exemple lorsque le vaccin est produit sur des oeufs provenant d'un élevage sain non EOPS, le procédé d'inactivation est également validé vis-à-vis d'une gamme de modèles d'agents étrangers représentatifs des agents étrangers potentiels. Un essai de mesure de l'efficacité du procédé d'inactivation est effectué aussitôt que possible après l'inactivation.

Essai de stérilité des intermédiaires précédant le vrac final. Les monographies spécifiques de vaccins à usage humain peuvent prescrire un essai de stérilité pour les produits intermédiaires.

En accord avec l'Autorité compétente, le remplacement de l'essai de stérilité par un essai pour évaluer la charge microbienne avec une limite basse fondée sur des résultats d'analyse de lots et la validation du procédé, peut être acceptable pour les produits intermédiaires qui précèdent le vrac final, sous réserve qu'une filtration stérilisante soit réalisée ultérieurement en cours de production.

Il est indispensable que l'intermédiaire soit filtré sur un filtre antibactérien avant conservation, que des seuils autorisés de la charge microbienne préfiltration aient été établis pour ladite filtration, et que des mesures adéquates soient mises en place pour éviter la contamination et la croissance des microorganismes pendant la conservation de l'intermédiaire.

Vrac final. Le vrac final est préparé par mélange aseptique des différents ingrédients du vaccin. Dans le cas des vaccins non liquides pour administration par une voie autre que parentérale, le vrac final est préparé par mélange des différents ingrédients du vaccin dans des conditions appropriées.

Adjuvants. Un ou plusieurs adjuvants peuvent entrer dans la formulation d'un vaccin pour potentialiser et/ou moduler la réponse immunitaire vis-à-vis du/des antigène(s). Ces adjuvants peuvent figurer dans la formulation du vaccin final ou être présents séparément. Un contrôle de la qualité et une caractérisation appropriés du/des adjuvant(s), seul(s) et

combiné(s) à l'antigène (ou aux antigènes), sont essentiels pour une production reproductible. Des spécifications relatives à la qualité sont établies pour chaque adjuvant, seul et combiné à l'antigène (ou aux antigènes).

Adsorbants utilisés comme adjuvants. Les vaccins peuvent être adsorbés sur de l'hydroxyde d'aluminium, du phosphate d'aluminium, du phosphate de calcium ou d'autres adsorbants appropriés. Les adsorbants sont préparés dans des conditions particulières qui leur confèrent la forme physique et les propriétés d'adsorption appropriées.

Si un adsorbant est utilisé comme adjuvant et est généré *in situ* au cours de la production du vaccin, des spécifications de qualité sont établies pour chaque ingrédient et pour l'adsorbant généré dans le vaccin. Les spécifications de qualité visent en particulier à contrôler :

- la composition chimique qualitative et quantitative,
- la forme physique et les propriétés d'adsorption associées, dans les cas appropriés, notamment si l'adjuvant est présent en tant qu'adsorbant,
- l'interaction entre adjuvant et antigène,
- la pureté, notamment la teneur en endotoxines bactériennes et la qualité microbiologique,
- tout autre paramètre jugé indispensable à la fonctionnalité.

La stabilité de chaque adjuvant, seul et combiné à l'antigène (ou aux antigènes), notamment en ce qui concerne les paramètres critiques, est établie lors des études de développement.

Conservateurs antimicrobiens. Des conservateurs antimicrobiens sont employés pour empêcher l'altération de la préparation ou éviter des effets indésirables suite à une contamination microbienne du vaccin pendant son utilisation. Les conservateurs antimicrobiens ne sont pas incorporés dans les préparations cryodesséchées. Généralement, il n'est pas acceptable d'incorporer un conservateur antimicrobien dans les préparations liquides unitaires. Dans le cas de préparations multidoses liquides, la nécessité d'un conservateur antimicrobien est évaluée, compte tenu de la possibilité de contamination pendant l'utilisation du vaccin et de la période maximale d'utilisation recommandée du réceptif entamé. Si le vaccin contient un conservateur antimicrobien, il est démontré que celui-ci n'affecte ni l'innocuité ni l'efficacité du vaccin. L'addition d'antibiotiques en tant que conservateurs antimicrobiens n'est généralement pas acceptable.

Au cours de la phase de développement, l'efficacité du conservateur antimicrobien pendant toute la durée de validité doit être démontrée à l'Autorité compétente.

L'efficacité du conservateur antimicrobien est évaluée comme décrit dans le chapitre 5.1.3. Lorsque ni les critères A ni les critères B ne peuvent être respectés, dans les cas justifiés les critères suivants sont appliqués aux vaccins pour usage humain : bactéries, pas d'augmentation à 24 h et à 7 jours, réduction de 3 log₁₀ à 14 jours, pas d'augmentation à 28 jours ; champignons, pas d'augmentation à 14 jours et à 28 jours.

Stabilité des intermédiaires. Pendant la production de vaccins, les intermédiaires sont obtenus à différents stades et sont conservés, parfois pour de longues durées. Ces intermédiaires incluent :

- des lots de semence et banques de cellules,
- des récoltes vivantes ou inactivées,
- des récoltes purifiées qui peuvent être des toxines ou des anatoxines, des polysides, des suspensions bactériennes ou virales,
- des antigènes purifiés,
- des antigènes adsorbés,
- des polysides conjugués,
- un vrac final,

- un vaccin dans son récipient final fermé, conservé à une température inférieure à celle utilisée pour les études de stabilité du produit final et destiné à être libéré sans nouvelle détermination de l'activité.

Sauf dans le cas où ils sont utilisés dans un bref délai, des études de stabilité sont conduites sur les intermédiaires dans les conditions de conservation prévues afin d'établir l'étendue prévue de la dégradation. Pour le vrac final, des études de stabilité peuvent être effectuées sur des échantillons représentatifs dans des conditions équivalentes à celles utilisées pour la conservation. Dans les cas appropriés, une durée de validité applicable dans les conditions de conservation prévues est établie au vu des études de stabilité pour chaque intermédiaire (sauf pour les lots de semence et les banques de cellules).

Lot final. Le lot final est préparé par répartition aseptique du vrac final dans des récipients stériles à fermeture inviolable qui sont fermés, dans les cas appropriés après cryodessiccation, de façon à prévenir toute contamination. Dans le cas des vaccins non liquides pour administration par une voie autre que parentérale, le lot final est préparé par répartition, dans des conditions appropriées, du vrac final dans des récipients stériles à fermeture inviolable. Dans des cas justifiés et autorisés, certains essais prescrits pour le lot final peuvent être effectués sur le vrac final s'il a été démontré que les opérations de fabrication ultérieures sont sans effet sur la conformité.

Aspect. Sauf exception justifiée et autorisée, chaque récipient (flacon, seringue ou ampoule) de chaque lot final est inspecté à l'œil nu ou de façon automatisée pour vérifier si l'aspect est acceptable.

Degré d'adsorption. Sauf exception justifiée et autorisée, dans le cas d'un vaccin adsorbé, une spécification du degré d'adsorption pour la libération des lots est établie en fonction des résultats trouvés pour des lots utilisés lors des essais cliniques. À partir des données de stabilité obtenues pour le vaccin, il doit être démontré que le degré d'adsorption à la fin de la période de validité n'est pas inférieur à celui des lots utilisés pour les essais cliniques.

Stabilité thermique. Si l'essai de stabilité thermique est prescrit dans une monographie de vaccin vivant atténué, effectuez l'essai sur le lot final pour contrôler la reproductibilité de la sensibilité à la chaleur des particules virales/bactériennes dans le produit d'un lot à l'autre. Les conditions appropriées sont indiquées dans la monographie spécifique. L'essai peut être omis comme essai de routine pour un produit donné, en accord avec l'Autorité compétente, si la reproductibilité du procédé de production a été démontrée par des paramètres pertinents tels que la régularité du rendement, le ratio des virus infectieux (des bactéries viables) avant et après cryodessiccation, l'activité à la libération et la stabilité en temps réel sous les conditions prescrites, ainsi que la stabilité thermique. En cas de changement significatif du procédé de fabrication du/des antigène(s) ou de la formulation, la nécessité d'une ré-introduction de l'essai sera examinée.

Stabilité. Pendant les études de développement, le maintien de l'activité du lot final pendant toute la durée de validité est démontré ; la perte d'activité dans les conditions de conservation recommandées est mesurée et une perte excessive peut indiquer que le vaccin n'est pas acceptable, même si l'activité reste supérieure au minimum acceptable.

Date de péremption. Sauf indication contraire, la date de péremption est calculée à partir du début de l'essai d'activité ou de la détermination du titre en virus selon le cas et pour les vaccins combinés à partir du début du premier essai d'activité ou de détermination de titre. Pour les vaccins conservés à une température inférieure à celle utilisée pour les études de stabilité et destinés à être libérés sans nouvelle détermination de l'activité, la date de péremption est calculée à partir de la date de sortie des conditions de froid. Si pour un vaccin

donné il n'est pas effectué de détermination de l'activité, la date de péremption du lot final est calculée à compter de la date de réalisation d'un essai indicatif de stabilité approuvé ou à défaut à compter de la date de lyophilisation ou de la date de conditionnement dans le récipient final. Dans le cas d'un vaccin combiné ayant des composants présentés en récipients séparés, la date de péremption correspond à celle du composant qui sera périmé en premier.

La date de péremption s'applique aux vaccins conservés dans les conditions prescrites.

Essai sur animaux. Conformément aux dispositions de la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, les essais doivent être réalisés de telle façon qu'ils utilisent le moins d'animaux possible et qu'ils réduisent au minimum toutes douleurs, souffrance, détresse ou nuisance durable. Les critères d'évaluation des essais dans les monographies doivent être mis en application en tenant compte de ces considérations. Par exemple, s'il est indiqué qu'un animal est considéré positif, infecté, etc., quand apparaissent des signes cliniques typiques ou en cas de mort de l'animal, alors, dès que l'indication suffisante d'un résultat positif est obtenue, l'animal en question doit être euthanasié ou recevoir un traitement approprié pour éviter toute souffrance inutile. Conformément aux Prescriptions Générales, des méthodes d'essai de remplacement peuvent être utilisées pour démontrer la conformité à la monographie et l'utilisation de tels essais est particulièrement encouragée quant elle entraîne le remplacement ou la réduction de l'utilisation d'animaux ou la réduction de leur souffrance.

ESSAI

Les vaccins satisfont aux essais prescrits dans les monographies spécifiques, y compris dans les cas appropriés, aux essais figurant ci-après.

pH (2.2.3). Les vaccins liquides, après reconstitution dans les cas appropriés, satisfont aux limites de pH approuvées pour la préparation considérée.

Adjuvant. Si le vaccin contient un adjuvant, sa teneur est déterminée et il est démontré qu'elle est dans les limites acceptables par rapport à la teneur attendue (voir également les essais de l'aluminium et du calcium ci-dessous).

Aluminium (2.5.13) : au maximum 1,25 mg d'aluminium (Al) par dose humaine unitaire lorsqu'un adsorbant à base d'aluminium a été utilisé, sauf indication contraire.

Calcium (2.5.14) : au maximum 1,3 mg de calcium (Ca) par dose humaine unitaire lorsqu'un adsorbant à base de calcium a été utilisé, sauf indication contraire.

Formaldéhyde libre (2.4.18) : au maximum 0,2 g/L en formaldéhyde libre dans le lot final lorsque le formaldéhyde a été utilisé pendant la préparation du vaccin, sauf indication contraire.

Phénol (2.5.15) : au maximum 2,5 g/L dans le produit final lorsque le phénol a été utilisé pendant la préparation du vaccin, sauf indication contraire.

Eau (2.5.12) : au maximum 3,0 pour cent m/m lorsque le vaccin est cryodesséché, sauf indication contraire.

Volume extractible (2.9.17). Sauf exception justifiée et autorisée, le vaccin satisfait aux exigences relatives au volume extractible.

Endotoxines bactériennes. Sauf exception justifiée et autorisée, un essai des endotoxines bactériennes est effectué sur le produit final. S'il n'est pas spécifié de limite dans la monographie spécifique, la teneur en endotoxines bactériennes, déterminée par une méthode appropriée (2.6.14), est inférieure à la limite approuvée pour le produit considéré.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière. Sauf indication contraire, les vaccins sont conservés à une température de 5 ± 3 °C et les vaccins liquides et adsorbés ne doivent pas être congelés.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le nom de la préparation,
- une référence qui identifie le lot final,
- la dose humaine recommandée et la voie d'administration,
- les conditions de conservation,
- la date de péremption,
- le nom et la concentration du conservateur antimicrobien, le cas échéant,
- le nom des antibiotiques, adjuvants, aromatisants et stabilisants présents, le cas échéant, dans le vaccin,
- dans les cas appropriés, que le vaccin est adsorbé,
- la mention des substances susceptibles de provoquer des réactions secondaires, des contre-indications pour l'utilisation du vaccin,
- dans le cas des vaccins cryodesséchés :
 - le nom ou la composition et le volume du liquide de reconstitution à ajouter,
 - la période pendant laquelle le vaccin doit être utilisé après reconstitution.

04/2013:0062

VACCINS POUR USAGE VÉTÉRINAIRE**Vaccina ad usum veterinarium**

Dans le cas des vaccins combinés, pour chacun des composants faisant l'objet d'une monographie de la Pharmacopée, les dispositions de cette monographie s'appliquent avec, le cas échéant, les modifications indiquées dans les chapitres 5.2.6. Evaluation de l'innocuité des vaccins et immunosérum vétérinaires et 5.2.7. Evaluation de l'efficacité des vaccins et immunosérum vétérinaires. Si un produit immunologique pour usage vétérinaire est destiné à un usage mineur, certains essais peuvent être exclus sous réserve de l'accord de l'Autorité compétente⁽¹⁾.

1. DÉFINITION

Les vaccins pour usage vétérinaire sont des préparations contenant des substances antigéniques destinées à induire une immunité active spécifique contre des maladies provoquées par des bactéries, des toxines, des virus, des champignons ou des parasites. Ces vaccins, vivants ou inactivés, induisent une immunité active, qui peut être transmise passivement par les anticorps d'origine maternelle, envers les agents infectieux qu'ils contiennent, et parfois également envers des organismes apparentés du point de vue antigénique. Ils peuvent contenir des bactéries, des toxines, des virus ou des champignons, vivants ou inactivés, des parasites, des fractions antigéniques ou des substances élaborées par ces organismes et rendues inoffensives, mais ayant conservé tout ou partie de leurs propriétés antigéniques ; les vaccins peuvent également être constitués par des mélanges de ces divers composants. Les antigènes peuvent être préparés par la méthode dite de l'ADN recombinant. Des adjuvants appropriés peuvent être incorporés afin d'améliorer les propriétés immunisantes des vaccins.

Certains termes employés dans les monographies des vaccins pour usage vétérinaire sont définis dans le chapitre 5.2.1.

1-1. VACCINS BACTÉRIENS ET ANATOXINES BACTÉRIENNES

Les vaccins et les anatoxines bactériens sont préparés à partir de cultures en milieux liquides ou solides adéquats, ou par d'autres procédés appropriés ; cette section ne s'applique pas aux vaccins bactériens préparés en cultures cellulaires ou sur animaux vivants. La souche de bactérie utilisée peut avoir été modifiée par génie génétique. L'identité, l'activité antigénique et la pureté de chaque culture bactérienne utilisée sont soigneusement contrôlées.

Les vaccins bactériens contiennent des bactéries vivantes ou inactivées, ou leurs composants antigéniques ; ce sont des préparations liquides d'opacité variable ou des préparations cryodesséchées.

Les anatoxines bactériennes sont préparées à partir de toxines, par réduction à un niveau très bas ou neutralisation complète de leur toxicité par des moyens physiques ou chimiques ; les moyens mis en œuvre sont tels qu'ils n'altèrent pas l'activité immunisante du vaccin. Les toxines sont obtenues à partir de souches sélectionnées de microorganismes spécifiques, cultivés sur des milieux appropriés ou sont obtenues par d'autres méthodes appropriées, par exemple la synthèse chimique.

Les anatoxines peuvent être :

- liquides,
- précipitées par l'alun ou tout autre agent approprié,
- purifiées et/ou adsorbées sur du phosphate d'aluminium, de l'hydroxyde d'aluminium, du phosphate de calcium ou tout autre adsorbant spécifié dans les monographies.

Les anatoxines bactériennes sont des liquides limpides ou légèrement opalescents. Les anatoxines adsorbées se présentent sous forme de suspensions ou d'émulsions. Certaines anatoxines peuvent être cryodesséchées.

Sauf indication contraire, les dispositions et exigences mentionnées ci-dessous pour les vaccins bactériens s'appliquent de la même façon aux vaccins et aux anatoxines bactériennes et aux produits contenant un mélange de cellules bactériennes et d'anatoxine.

1-2. VACCINS VIRAUX

Les vaccins viraux sont préparés par multiplication en cultures cellulaires appropriées (5.2.4), dans des tissus, dans des microorganismes, dans des oeufs embryonnés ou, lorsqu'il n'y a aucune autre possibilité, dans un animal vivant, ou par tout autre moyen approprié. La souche de virus utilisée peut avoir été modifiée par génie génétique. Ce sont des préparations liquides ou cryodesséchées d'un ou de plusieurs virus ou de sous-unités ou peptides viraux.

Les vaccins viraux vivants sont préparés à partir de virus de virulence atténuée ou de faible virulence naturelle envers l'espèce cible.

Les vaccins inactivés sont soumis à un procédé valide d'inactivation du virus et peuvent être purifiés et concentrés.

1-3. VACCINS UTILISANT DES VECTEURS

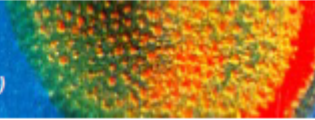
Les vaccins utilisant des vecteurs sont des préparations liquides ou cryodesséchées d'un ou de plusieurs microorganismes vivants (bactéries ou virus), non ou peu pathogènes, dans lesquels ont été insérés un ou plusieurs gènes exprimant des antigènes qui suscitent une réponse immunitaire protectrice vis-à-vis d'autres microorganismes.

2. PRODUCTION**2-1. PRÉPARATION DU VACCIN**

Les méthodes de préparation, qui varient selon le type de vaccin considéré, sont propres à assurer le maintien de l'intégrité et le pouvoir immunogène de l'antigène et à exclure toute contamination par des agents étrangers.

(1) NOTE : Guidelines on data requirements for immunological veterinary medicinal products intended for minor use or minor species/limited markets (EMA/CVMP/TWP/123243/2006, ainsi que les révisions ultérieures de ce document).

**ANNEXE 2 : Bulletin épidémiologique saison
2013/2014**



Grippe : bilan de la saison 2013/2014

Après 30 semaines de surveillance intensive, le Réseau des GROG est passé en veille allégée, c'est le moment de dresser le bilan de la saison écoulée.

L'impact global de cette épidémie de grippe A, de courte durée, est moindre que celui des épidémies de grippe des deux saisons précédentes.

- Selon sa première estimation, le Réseau des GROG évalue à 3,3 millions le nombre de personnes ayant consulté un médecin généraliste ou un pédiatre pour une grippe pendant la période épidémique (contre 9,8 millions en 2012-2013 et 3,5 millions en 2011-2012).

- Les détections de virus grippaux dans les prélèvements GROG sont restées très sporadiques jusqu'à début décembre et montraient la présence des 3 types et sous-types de virus grippaux : A(H1N1)pdm09, A(H3N2) et B.

La circulation concomitante des deux sous-types de virus A a ensuite augmenté, entraînant une épidémie modérée. Le seuil épidémique a été franchi pendant 6 semaines, de mi-janvier (semaine 04/2014) à fin février (semaine 9/2014).

(cf tableau récapitulatif des semaines épidémiques (octobre 1992 à avril 2014) et données historiques).

- Les virus A(H1N1)pdm09 ont été un peu plus actifs que les virus A(H3N2) : 55% / 45 %.

- L'analyse des virus grippaux, faite par le Centre National de Référence à partir des prélèvements GROG, montre que :

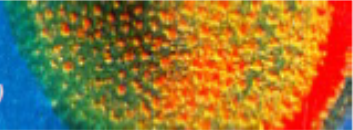
les virus du sous-type A(H1N1)pdm09 sont restés très proches de la souche pandémique et de la souche vaccinale A/California/7/2009 H1N1pdm09 ;

les virus A(H3N2) sont restés antigéniquement proches de la souche vaccinale A/Texas/50/2012 ;

sur le petit nombre de virus B diagnostiqué et analysé, la grande majorité correspondait au lignage retenu pour le vaccin (Yamagata).

- Les virus grippaux ont été actifs au cours de la même période dans toutes les régions, mais l'impact a été un peu plus fort et un peu plus prolongé dans le sud-est de l'hexagone.

- Toutes les tranches d'âge ont été concernées, mais l'impact sur le recours aux soins ambulatoires a été plus important pour les jeunes enfants (entre 0 et 4 ans, 1 enfant sur 4 a consulté).



Grippe : bilan de la saison 2013/2014

Situation de la grippe pour la semaine 2014/27

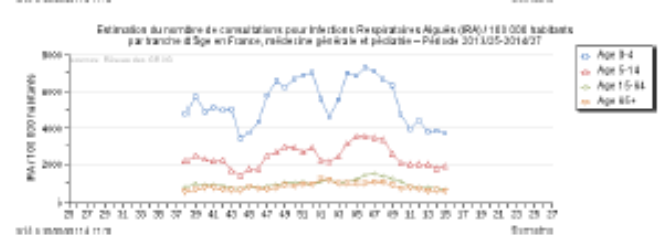


Financement : Institut de Veille Sanitaire, Laboratoires Sanofi Pasteur MSD, Laboratoire Abbott Products SAS, Laboratoire Roche, Laboratoire Argène, Laboratoire GSK. L'association Réseau des GROG est financée à 72% par des fonds provenant d'organismes publics.

Autres partenariats : Institut Pasteur, Service de Santé des Armées, SCHS Mairie de St Etienne, Service médical PSA Citroën Rennes, OCP-Réparation, SOS Médecins France, MED'cal Concept, Association Médecins de Montagne, Domus VI, RENAL, Open Rome.

Responsabilité scientifique : Marc Barrière, Bernard Bedouret, Jean-Louis Bensoussan, Hervé Berche, Jean Marie Cohen, Emmanuel Debost, Anne Mosnier, Pierre Pothier, Bruno Uina, Marcel Ruetzsch, Jean-Claude Souliary, Sylvie van der Werf.

Coordination nationale : Réseau des GROG avec l'aide d'Open Rome, 57 rue du Poteau, 75018 Paris.
Tél: 01.56.55.51.68 - Fax: 01.56.55.51.52 - E-mail: grog@grog.org
Site : <http://www.grog.org>



Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2013/2014

Nom : DULOUEARD
Prénom : Pauline

Titre de la thèse : Fabrication du vaccin contre la grippe saisonnière

Mots-clés : grippe, vaccin, répartition aseptique, seringue, suspension parentérale, virus grippal, souches

Résumé : La **grippe** (ou *influenza*) est une maladie infectieuse fréquente et contagieuse causée par trois virus à ARN de la famille des *Orthomyxoviridae* (*Myxovirus influenzae A*, B et C), touchant les oiseaux et certains mammifères dont le porc, le phoque, et l'être humain. De sa conception à son injection, le vaccin subit de nombreuses étapes et de nombreux contrôles. De la détermination des souches, en passant par la réalisation des cuves, le remplissage des seringues, le conditionnement et la distribution, chaque étape est tracée et enregistrée. La fabrication du vaccin contre la grippe saisonnière se fait préférentiellement en seringue pré-remplie. Depuis son développement dans les années 30, le vaccin contre la grippe saisonnière fabriqué à partir d'œufs de poule embryonnés, a fait l'objet de très peu de modifications du procédé de fabrication. Ce procédé de fabrication est validé et a prouvé son efficacité.

Le vaccin contre la grippe saisonnière fait toujours l'objet de recherche pour améliorer son efficacité ou moderniser son procédé de fabrication.

Membres du jury :

Président : (Gayot, Anne, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie de Lille)

Assesseur(s) : (Muschert, Susanne, Maître de conférences, Faculté de Pharmacie de Lille)

Membre(s) extérieur(s) : (Bechu, Thomas, Responsable conditionnement Sanofi Le Trait)

(Gillier, Aurélien, Coordinateur Projets Travaux Neufs Sanofi Le Trait)