

**UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNÉE : 2015

THÈSE : 2015 TOU3 2103

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

DELPECH Romain

**ÉTAT DES LIEUX PASSÉ ET ACTUEL
DE L'INSULINE
(THÉRAPIES ET PROCÉDÉS)
ET PERSPECTIVES D'ÉVOLUTION**

Date de soutenance

26 novembre 2015

-

Directeur de thèse: M. NONN Alain, PhD

JURY

Président : Pr. COUDERC Bettina, PhD
1er assesseur : Dr. BENHAMI Chérifa, PharmD
2ème assesseur : Mme. MONFERRAN Sylvie, PhD

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} octobre 2014

Professeurs Émérites

M. BASTIDE R	Pharmacie Clinique
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G	Physiologie
M. CHAVANT L	Mycologie
Mme FOURASTÉ I	Pharmacognosie
M. MOULIS C	Pharmacognosie
M. ROUGE P	Biologie Cellulaire

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CHATELUT E	Pharmacologie
M. FAVRE G	Biochimie
M. HOUIN G	Pharmacologie
M. PARINI A	Physiologie
M. PASQUIER C (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A	Pharmacologie
Mme SALLERIN B	Pharmacie Clinique
M. SIÉ P	Hématologie
M. VALENTIN A	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A	Biologie
Mme BAZIARD G	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S	Mathématiques – Biostat.
M. BENOIST H	Immunologie
Mme BERNARDES-GÉNISSON V	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B	Biochimie
M. CUSSAC D (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme DOISNEAU-SIXOU S	Biochimie
M. FABRE N	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E	Pharmacologie
Mme MULLER-STAU MONT C	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F	Chimie analytique
M. SALLES B	Toxicologie
Mme SAUTEREAU A-M	Pharmacie galénique
M. SÉGUI B	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P	Chimie analytique
Mme TABOULET F	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P	Pharmacie Clinique	Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme GANDIA-MAILLY P (*)	Pharmacologie	Mme AUTHIER H	Parasitologie
Mme JUILLARD-CONDAT B	Droit Pharmaceutique	M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
M. PUISSET F	Pharmacie Clinique	Mme BON C	Biophysique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S	Biochimie	M. BOUJILA J (*)	Chimie analytique
Mme THOMAS F	Pharmacologie	Mme BOUTET E	Toxicologie - Sémiologie
		M. BROUILLET F	Pharmacie Galénique
		Mme CABOU C	Physiologie
		Mme CAZALBOU S (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S	Bactériologie - Virologie
		Mme COSTE A (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N	Biochimie
		Mme DERAËVE C	Chimie Thérapeutique
		Mme ÉCHINARD-DOUIN V	Physiologie
		Mme EL GARAH F	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F	Toxicologie
		Mme GIROD-FULLANA S (*)	Pharmacie Galénique
		Mme HALOVA-LAJOIE B	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I	Biochimie
		Mme LEFEVRE L	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A	Biochimie
		M. MARTI G	Pharmacognosie
		Mme MIREY G (*)	Toxicologie
		Mme MONTFERRAN S	Biochimie
		M. OLICHON A	Biochimie
		M. PERE D	Pharmacognosie
		Mme PHILIBERT C	Toxicologie
		Mme PORTHE G	Immunologie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K (*)	Chimie Analytique
		M. SAINTE-MARIE Y	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D	Hématologie
		Mme TOURRETTE A	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M	Mathématiques

(*) titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires		Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche	
Mme COOL C (**)		Mme PALOQUE L	
Mme FONTAN C	Physiologie	Mme GIRARDI C	
Mme KELLER L	Biophysique	M IBRAHIM H	Parasitologie
M. PÉRES M. (**)	Biochimie		Pharmacognosie
Mme ROUCH L	Immunologie		Chimie anal. - galénique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique		
	Pharmacie Clinique		

(**) Nomination au 1^{er} novembre 2014

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse Mr. Alain NONN, qui en plus d'avoir été mon maître d'apprentissage au cours de ma sixième année de pharmacie, a accepté cette fonction, plutôt chronophage, de directeur de thèse, malgré un emploi du temps bien chargé. Son soutien tout au long de l'année ainsi que ses remarques et ses conseils m'ont permis de beaucoup apprendre.

Je remercie également mesdames Bettina COUDERC, Chérifa BENHAMI et Sylvie MONFERRAN pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je n'oublie pas ma famille et mes amis qui ont su tenir compte de la difficulté de mes études et m'épauler tout au long de ces six années.

Une pensée à mes collègues de la série A, avec qui j'ai partagé de nombreux bons moments au cours de ces trois années passées ensemble en TP.

Un grand merci à mes amis de fac, Cécile, Maïlys, Lucie, Flore, Emilie, Liza, Yoan et les autres, pour ces innombrables bons souvenirs, et sans qui mes études n'auraient pas été ce qu'elles ont été.

Merci aussi à Messieurs Donat Meyer et Thierry Vandamme pour leur investissement au sein du Master 2 Professionnel Ingénierie Pharmaceutique à l'Université de Strasbourg, et pour l'esprit critique qu'ils m'ont permis d'acquérir de par la multitude des entreprises que j'ai pu visiter.

Et enfin, Camille, sans toi je n'aurais pas pu avancer ma thèse si vite. Je te remercie tout particulièrement pour ton soutien inconditionnel tout au long de ces mois où l'écriture de nos thèses nous a demandé beaucoup d'efforts et de ténacité.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	7
1. L'INSULINE DANS LE TRAITEMENT DU DIABETE : HISTORIQUE ET MODE D'ACTION	8
A- LE DIABETE	8
1) DECOUVERTE DE LA MALADIE	8
2) PRESENTATION GENERALE DES DIFFERENTS TYPES DE DIABETES	10
3) LES TRAITEMENTS ACTUELS DU DIABETE	15
B- L'INSULINE	18
1) DECOUVERTE DE L'INSULINE	18
2) L'EVOLUTION DES TRAITEMENTS JUSQU'À NOS JOURS	22
3) LES SYSTEMES D'ADMINISTRATION DE L'INSULINE (POMPES, FLACONS, STYLOS)	25
3.1- La pompe à insuline	25
3.2- Le stylo-injecteur	29
3.3- La seringue et le flacon	30
C. ACTIVITE ENDOGENE DE L'INSULINE	31
1) SYNTHÈSE	31
2) MODE D'ACTION	34
3) DEGRADATION	36
2. L'INSULINE SYNTHETIQUE : DES PARAMETRES CRITIQUES AU COURS D'UN PROCEDE DE FABRICATION COMPLEXE	38
A- IMPACTS CHIMIQUES SUR L'INSULINE	38
1) INFLUENCE DU pH	39
1.1- Le pH : définition	39
1.2- Impacts du pH sur l'insuline	41
1.3- Gestion du pH	43
2) INFLUENCE DES EXCIPIENTS	43
2.1- Les solutions tampons	43
2.2- Les conservateurs	45
2.3- Les substances isotonisantes	46
2.4- Le zinc	47
3) AUTRES FACTEURS CHIMIQUES	48
B- IMPACTS PHYSIQUES SUR L'INSULINE	49
1) INFLUENCE DE LA CHALEUR SUR LES PROTEINES D'INSULINE	49
1.1- Réactions chimiques pouvant survenir	49
1.2- Impact de la température sur l'activité de l'insuline	50
1.3- Conseils au patient pour une bonne utilisation	51
1.4- Aspect industriel	52

2)	INFLUENCE DU FROID	52
3)	IMPACT DE LA LUMIERE	54
3.1-	Réactions chimiques pouvant survenir	54
3.2-	Protection de l'insuline contre la lumière dans l'industrie	58
3.	<u>QUELLES EVOLUTIONS POUR LE TRAITEMENT DU DIABETE ?</u>	59
A-	LES ANALOGUES DE L'INSULINE	59
B-	LES AUTRES VOIES D'ADMINISTRATION DE L'INSULINE	65
1)	LA VOIE ORALE	66
2)	LA VOIE PULMONAIRE	69
C-	LA RESTAURATION DE LA SECRETION PANCREATIQUE D'INSULINE	71
1)	LE PANCREAS BIO-ARTIFICIEL	72
2)	LES GREFFES D'ÎLOTS DE LANGERHANS	74
3)	LES CELLULES SOUCHES	76
	CONCLUSION	79
	TABLE DES ILLUSTRATIONS	80
	BIBLIOGRAPHIE	81

INTRODUCTION

L'insuline est la principale hormone hypoglycémisante sécrétée chez l'Homme ; dans le cas où son métabolisme est perturbé cela déclenche une pathologie appelée « diabète ». Il en existe deux types principaux, touchant actuellement environ 385 millions de personnes dans le monde et dont les origines sont différentes. Le diabète de type I représente 5 à 10% des patients diabétiques, il est dû à un déficit de sécrétion de l'insuline par le pancréas d'origine immune et génétique. Le diabète de type II représente lui 90% des patients et résulte d'une utilisation inappropriée de l'insuline par l'organisme. Une des principales causes s'avère être une mauvaise hygiène alimentaire amenant très souvent au développement de l'obésité.

Cette pathologie est connue depuis de nombreuses années, et compte-tenu de sa prévalence croissante à travers le monde, les scientifiques n'ont cessé de travailler sur différents traitements pour tenter de la réduire. Le but actuel des recherches est de proposer une insuline dont le profil d'action est aussi proche que possible de l'insuline issue du cycle sécrétoire physiologique.

Ainsi dans une première partie, nous verrons l'évolution des traitements insuliniques proposés aux patients au cours du siècle dernier. Puis, dans un deuxième temps nous aborderons l'aspect industriel et les paramètres critiques qu'il est nécessaire de maîtriser au cours du procédé de fabrication. Enfin, nous terminerons par les perspectives d'évolution du traitement du diabète, aussi bien en termes de molécules analogues de l'insuline, que de voies d'administration, ou encore d'alternatives à l'insuline.

1. L'insuline dans le traitement du diabète : historique et mode d'action

a- Le diabète

1) Découverte de la maladie

Même si la molécule d'insuline n'a été caractérisée que tardivement, son déficit est à l'origine d'une maladie, le diabète, qui elle a été identifiée beaucoup plus tôt.

Bien avant que cette pathologie ne porte le nom de diabète, les symptômes avaient été décrits sans qu'on n'en connaisse la cause.

Ainsi le prouvent, des ouvrages de médecine chinoise datant de 4000 ans avant J.C. qui mentionnent l'existence de cette maladie ou encore, en Egypte un papyrus, daté de 3000 ans à 1500 ans avant J.C. et nommé « Papyrus Ebers », donne la première description écrite des symptômes du diabète sucré. Il mentionne notamment le besoin irrésistible de boire et des urines abondantes (1). A la même époque, deux médecins Indiens Suçruta et Charaka décrivent que l'urine de ces malades attire les fourmis et se servent de cette découverte comme méthode de diagnostic de la maladie (2).

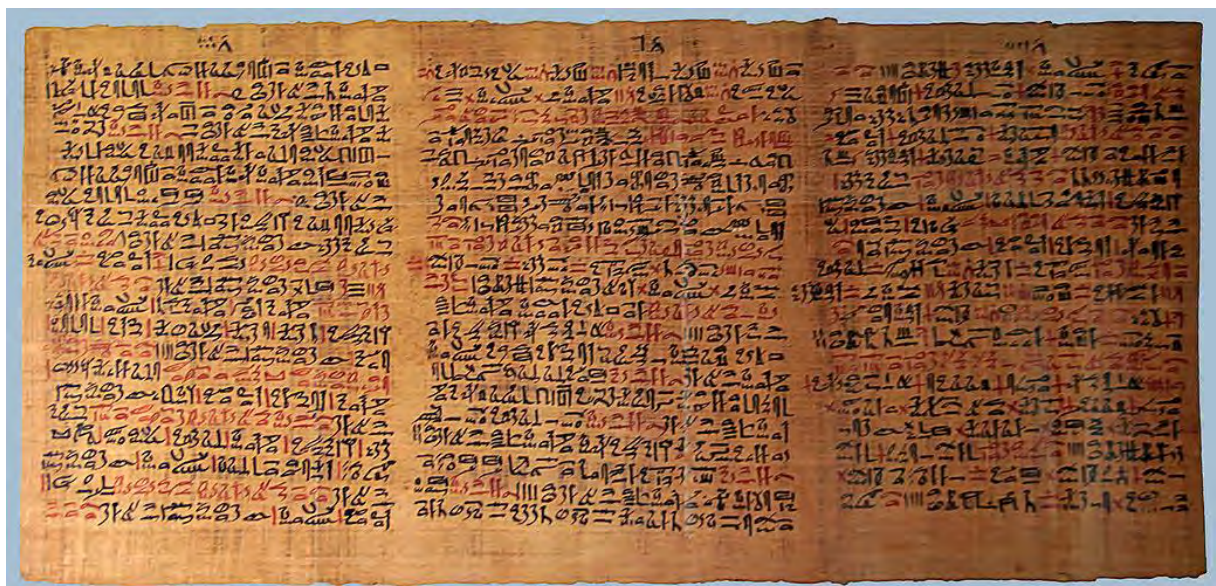


Figure 1 : Papyrus Ebers (3)

Un peu plus tard, pendant l'Antiquité, on sait que le diabète était connu des Grecs et des Egyptiens.

C'est un médecin grec, Arétée de Cappadoce (1^{er} ou 2^{ème} siècle après J.C.) qui lui donne le nom de « diabêtès » qui signifie « je passe à travers » en grec et qui se rapporte au fait de boire et d'uriner beaucoup. D'après lui l'origine se trouve dans l'estomac tandis que pour Galien (129-216 après J.C) il s'agissait d'une maladie des reins. Le diabète qui vient d'une

concentration trop élevée de glucose dans le sang, fut longtemps considéré comme une maladie des reins ou du foie (1).

On le retrouve ainsi mentionné par exemple dans une œuvre de Galien, père de la pharmacie et médecin grec qui exerçait à Rome, sous la forme : « Les reins et la vessie ne cessent d'émettre des urines. Il ne peut s'empêcher de boire et d'uriner ».

En 1674, il est mis en évidence que l'urine des patients diabétiques a un goût sucré et laisse un résidu à l'évaporation. Thomas Willis (1621-1675) va alors donner le nom latin de « diabetes mellitus » au diabète sucré et qui signifie « qui a un goût de miel » (2).

C'est en 1776 que le sucre est isolé dans les urines, par le chimiste Dolson. Une réaction avec la liqueur de Fehling permet alors de mesurer la glycosurie (présence de glucose dans les urines). Cette expérience lui a aussi permis de montrer que ce n'était pas seulement l'urine des diabétiques qui contenait du sucre mais aussi leur sérum sanguin.

John Rollo (1750-1809), un médecin écossais du XVIII^{ème} siècle, propose à des patients de faire un régime alimentaire particulier parce qu'il a remarqué que la quantité de glucose présente dans les urines dépendait de leur alimentation. Il demande alors aux patients de tenir un carnet de surveillance des aliments pour permettre un suivi de la maladie. C'est une pratique encore utilisée de nos jours.

Claude Bernard (1813-1878), médecin et physiologiste français, montre en 1855 que la glycémie reste quasiment constante quelle que soit l'alimentation. Il met aussi en évidence le rôle du foie dans le stockage du glucose sous la forme de glycogène (une molécule stockée et transformable en glucose selon les besoins de l'organisme). Selon lui, le diabète est « un trouble général de la nutrition » dont la glycosurie n'est qu'un symptôme.



Figure 2 : Portrait de Claude Bernard (4)

Paul Langerhans (1847-1888) un anatomo-pathologiste et biologiste allemand découvre en 1869 que le pancréas contient, à côté des cellules sécrétant le suc pancréatique, d'autres cellules, regroupées en îlots. Ces cellules seront alors baptisées, en 1893 « îlots de Langerhans » par Edouard Laguesse (1861-1927).



Figure 3 : Portrait de Paul Langerhans (5)

Cette découverte a permis de montrer qu'il existait deux types de cellules au sein du pancréas : une première population qui permet la sécrétion du suc pancréatique et qui contient diverses enzymes digestives et une seconde regroupée en îlots et dont la fonction restait inconnue.

Le lien réel entre le pancréas et le diabète sucré n'est établi qu'en 1889 lorsque les médecins allemands Oskar Minkowski (1858-1931) et Josef Von Mering (1849-1908) montrent expérimentalement que l'ablation du pancréas chez un chien déclenche cette maladie.

2) Présentation générale des différents types de diabètes

Le diabète est une pathologie chronique qui se caractérise par une hyperglycémie, c'est-à-dire un excès de sucre dans le sang, dont le taux à jeun est égal ou supérieur à 1,26 g/L (7 mmol/L) de sang.

Pour diagnostiquer un diabète, une prise de sang réalisée à jeun (depuis au moins huit heures) est nécessaire. Il s'agit de mesurer la glycémie. On pourra poser un diagnostic si cette glycémie à jeun est égale ou supérieure à 1,26 g/L est constatée lors de deux mesures successives.

Il existe deux principaux types de diabète (6).

Le diabète de type 1 :

Le diabète de type 1 est dû à une sécrétion insuffisante, voire absente, de l'insuline par le pancréas. Il se développe principalement chez le sujet jeune (pendant l'enfance ou l'adolescence dans un cas sur deux) et c'est le moins fréquent des deux types de diabète.

La sécrétion insuffisante d'insuline par le pancréas est due à la destruction progressive des cellules bêta du pancréas, à l'origine de la production de cette hormone, ou des îlots de Langerhans eux-mêmes, dans lesquels ces cellules sont concentrées.

La cause de cette perte de production est une réaction anormale du système immunitaire à l'encontre des cellules bêta, ce qui va engendrer leur destruction et donc la diminution progressive de la sécrétion d'insuline jusqu'à son arrêt total.

Cette réaction, liée à une prédisposition génétique, pourrait aussi être déclenchée par des événements extérieurs comme des infections virales.

Ainsi, le risque de survenue d'un diabète de type 1 est plus important lorsqu'un parent proche, comme le père ou la mère, présente déjà un diabète de type 1.

Les symptômes du diabète de type 1 n'apparaissent que tardivement quand plus de 80% des cellules ont été détruites et sont identiques quel que soit l'âge (7). Ils surviennent en général brutalement, en quelques jours ou semaines. On peut noter une polydipsie (soif intense), une pollakiurie (envie fréquente d'uriner), qui sont les deux premiers symptômes historiquement associés à cette pathologie, une hyperphagie (appétit augmenté) mais qui s'associe à un amaigrissement, on retrouve aussi parfois une haleine qui sent l'acétone, des maux de ventre et des vomissements et très souvent de la fatigue. Dans les cas extrêmes, on peut arriver jusqu'à un coma dit acéto-cétosique lorsqu'une trop grande concentration de corps cétoniques est présente dans le sang.

Les corps cétoniques sont à l'origine de l'insulino-sécrétion. Une absence de réponse induit ainsi une augmentation de leur sécrétion et donc de leur concentration. Eux-mêmes sont originaires du tissu adipeux et produits par lipolyse, ce qui explique l'amaigrissement des personnes diabétiques (8).

Selon l'INVS (l'Institut National de Veille Sanitaire), la fréquence du diabète de type 1 chez l'enfant et l'adolescent était de 13,5 pour 100 000 personnes en France en 2004. Elle est en augmentation régulière depuis 20 ans (+ 3,7 % par an) (7).

Le diabète de type 2 :

Le diabète de type 2 est lui dû à une mauvaise utilisation de l'insuline par les cellules de l'organisme, que l'on appelle phénomène d'insulinorésistance, puis à un épuisement des cellules sécrétrices amenant à une insulinodéficience. Il s'agit du diabète le plus fréquent puisqu'il représente 90 % des diabétiques. Le diabète de type 2 évolue progressivement sur plusieurs années, de manière insidieuse puisque les symptômes ne sont pas toujours visibles et se caractérisent par deux phases.

On assiste tout d'abord à une résistance des cellules de l'organisme à l'insuline. Cette résistance se développe avec l'âge et est physiologique. Cependant, elle va être aggravée par un excès de tissus adipeux en cas de surpoids et surtout d'obésité. On appelle ce stade la « phase d'insulinorésistance ».

L'organisme va alors tenter de s'adapter en augmentant dans un premier temps la production d'insuline par le pancréas. C'est ce que l'on appelle l'hyperinsulinisme. Effectivement, plus on augmente la concentration d'insuline circulante plus la probabilité d'action de la molécule est importante.

Après plusieurs années d'hyperinsulinisme (une à deux décennies), le pancréas s'épuise et n'arrive plus à sécréter suffisamment d'insuline pour réguler le taux de glycémie dans le sang. On en arrive à la « phase d'insulinodéficience ».

Le plus souvent, le diabète de type 2 demeure asymptomatique et évolue en silence jusqu'au jour où il est découvert à l'occasion d'une prise de sang. A ce moment-là, un traitement va pouvoir être mis en place dans le but de diminuer la glycémie et de prévenir les complications. Des examens cliniques réguliers vont alors devenir nécessaires. Les signaux d'alerte peuvent être les mêmes que ceux du diabète de type 1 mais ils sont généralement plus rares et moins intenses.

Cependant, il existe parfois quelques signes qui peuvent alerter comme une asthénie chronique, une polydipsie, une hyperphagie, une pollakiurie, des démangeaisons notamment au niveau des organes génitaux, une cicatrisation lente des plaies, une sécheresse des yeux ou encore une plus grande sensibilité aux infections.

Des examens de différents types vont être réalisés :

- **Examens cliniques :**
 - Le poids
 - Le calcul de l'indice de masse corporelle (IMC)

- La mesure de la tension artérielle
- L'examen des vaisseaux sanguins
- L'examen neurologique
- **Examens biologiques :**
 - Le dosage de l'hémoglobine glyquée (reflet du taux de glycémie dans le sang au cours des mois précédents)
 - Le taux de cholestérol sanguin
 - Exploration de la fonction rénale.
- **Des examens complémentaires :**
 - Un électrocardiogramme
 - Un examen ophtalmologique : le fond d'œil.

Les principales complications du diabète de type 2 qui sont aussi liées à l'obésité (athérosclérose, hypertriglycémie, hypercholestérolémie) et à des pathologies sous-jacentes sont :

- **Les macroangiopathies (9) :**
 - Accident vasculaire cérébral par atteinte des artères cérébrales
 - Formation d'un caillot au niveau des artères coronaires pouvant entraîner un angor ou encore un infarctus du myocarde
 - Artérite au niveau des membres inférieurs pouvant induire une gangrène et donc une amputation (notamment au niveau des pieds)
- **Les microangiopathies (7) :**
 - La rétinopathie pouvant engendrer une cécité (le diabète est la première cause de cécité en France) par atteinte des capillaires sanguins de la rétine
 - La néphropathie : insuffisance rénale par atteinte des vaisseaux irrigants les glomérules du rein, ce qui va diminuer progressivement la capacité du rein à filtrer (peut devenir terminale et nécessiter des dialyses)
 - La neuropathie : la forme la plus fréquente étant la polyneuropathie distale et symétrique (atteinte des nerfs des membres inférieurs notamment les pieds) à l'origine de troubles sensitifs

Un suivi médical est alors indispensable pour prévenir ces pathologies graves qui peuvent être mortelles.

Le diabète de type 2 touche 4 % de la population française, soit environ 2,5 millions de personnes. C'est un chiffre qui va en augmentant chaque année. Ce diabète qui se manifestait généralement après l'âge de 40 ans commence à apparaître chez des adolescents et de jeunes adultes dans le cas de populations obèses. On parle d'une véritable épidémie de diabète de type 2. D'après les prévisions de l'OMS, le nombre de diabétiques de type 2 devrait passer de 135 à 300 millions dans le monde entre 1995 et 2025. C'est une maladie chronique en pleine expansion. Ainsi, entre 1999 et 2016, le nombre de personnes traitées pour un diabète dans notre pays augmenterait de 44 %. Pour 14% des cas cette augmentation devrait être due à la croissance de la population, 48 % à son vieillissement, qui est inévitable et pour les 38 % restants, à l'augmentation de l'obésité, qui elle, pourrait être mieux contrôlée (10).

Autres types de diabètes :

Il existe aussi des formes plus rares de diabète comme le diabète gestationnel (diabète temporaire qui survient chez certaines femmes enceintes) ou le diabète MODY (Maturity Onset Diabetes Of the Young), un diabète lié à la mutation d'un gène (représente entre 2 à 5% des diabètes non insulino-dépendants).

Facteurs de risque :

Il existe de nombreux facteurs de risque pour le développement d'un diabète. On peut ainsi citer les mauvaises habitudes de vie, mais aussi des pathologies sous-jacentes qui vont favoriser son développement.

Les facteurs de risque les plus importants sont :

- Antécédents familiaux de diabète
- Surpoids/obésité
- Hypercholestérolémie
- Hypertension artérielle
- Tabagisme/alcoolisme
- Sédentarité
- Bébé pesant plus de 4 kg à la naissance, etc.

Le surpoids entraîne un épuisement du pancréas. En effet, celui-ci doit fournir beaucoup plus d'insuline pour réguler la glycémie, que chez un malade dont la masse corporelle est normale.

3) Les traitements actuels du diabète

Le premier traitement du diabète c'est la prévention :

Le diabète de type 1 étant d'origine génétique, il n'est pas possible de le prévenir. A l'inverse, le diabète de type 2 qui est majoritairement favorisé par le surpoids dépend beaucoup de l'hygiène de vie du malade et pourrait dans de nombreuses situations être évité. Ainsi, garder un poids correct en alliant une alimentation équilibrée à une activité physique régulière semblerait être la meilleure des préventions. Le surpoids multipliant par 10 le risque de développer un diabète, des études ont montré que toute perte de poids même modérée avait un effet bénéfique pour prévenir la maladie (11).

Les traitements du diabète de type 1 :

Le diabète de type 1 résulte d'un déficit de sécrétion d'insuline par le pancréas. Le traitement repose donc sur des injections sous-cutanées d'insuline, pluriquotidiennes, pour compenser ce défaut de production endogène.

C'est un traitement lourd qui demande de la rigueur dans son suivi, c'est pourquoi il nécessite une éducation thérapeutique pour le patient. Ce dernier doit apprendre à mesurer son taux de glycémie afin d'adapter les doses d'insuline à s'injecter et limiter le risque d'hypoglycémie (6).

Les traitements du diabète de type 2 :

Avant tout traitement pour un diabète de type 2, la première chose à mettre en place c'est des mesures hygiéno-diététiques, qui peuvent dans certains cas éviter la prise d'un traitement aux patients ou dans les autres cas, en optimiser l'efficacité.

Par mesures hygiéno-diététiques on entend sur le plan alimentaire : une alimentation équilibrée, une réduction de l'apport calorique, une meilleure répartition des prises alimentaires ainsi que l'augmentation de la consommation de fibres, auxquelles on va associer une activité physique régulière et adaptée (au moins trois fois 45 min par semaine) ainsi que l'arrêt de la consommation de tabac et d'alcool. Ces mesures non exhaustives seront accompagnées d'une surveillance de l'équilibre glycémique (12).

L'équilibre glycémique cible correspond au taux sanguin d'hémoglobine glyquée (HbA1C) à atteindre. Il sera adapté au patient par le médecin, en fonction de son profil et pourra évoluer au cours du temps. Cependant, pour la plupart des diabétiques de type 2, l'objectif est un taux d'hémoglobine glyquée inférieur ou égal à 7% (13).

Si les mesures hygiéno-diététiques ne suffisent pas ou plus pour atteindre « l'objectif glycémique cible », le médecin, en concertation avec son patient, pourra alors prescrire un traitement médicamenteux.

Ce type de traitement sera toujours débuté aux doses minimales afin d'en favoriser la tolérance. La dose sera progressivement augmentée en fonction des besoins du patient jusqu'à la dose maximale tolérée ou jusqu'à l'atteinte de l'objectif.

Les médicaments antidiabétiques :

Il existe actuellement trois groupes de médicaments antidiabétiques :

- Les médicaments de l'insulinorésistance :
 - Les biguanides : la Metformine qui est un médicament commercialisé en France depuis les années 60 est maintenant le seul représentant de cette famille. Les biguanides n'agissent pas sur la sécrétion d'insuline mais diminuent la synthèse hépatique du glucose et favorisent son absorption au niveau du foie principalement mais aussi au niveau des muscles et des tissus adipeux.
- Les insulinosécréteurs :
 - Les sulfamides hypoglycémiantes : ils agissent au niveau des cellules bêta du pancréas en se liant à un récepteur spécifique, qui va stimuler la sécrétion d'insuline. Le principal risque de ce traitement est l'hypoglycémie. On peut citer par exemple le Gliclazide ou encore le Glibenclamide.
 - Les glinides : ils agissent comme les sulfamides hypoglycémiantes mais avec une durée d'action plus courte. Exemple du Repaglinide.
 - Les incrétino-mimétiques : les incrétines sont des substances qui sont libérées au cours des repas et qui déclenchent la sécrétion d'insuline.
 - Les analogues des GLP-1 (Glucagon Like Peptide 1) : la GLP-1 est une incrétine libérée par le tube digestif au cours du repas et qui stimule la sécrétion d'insuline tout en inhibant la sécrétion de glucagon. Cette hormone va aussi ralentir la vidange gastrique et favoriser le sentiment de satiété. Cette famille de médicaments composée notamment de l'Exénatide et du Liraglutide s'administre par voie sous-cutanée. Leur structure est modifiée pour leur permettre d'agir plus longtemps et de les rendre insensibles à l'action des DPP4 (Dipeptidyl Peptidase-4) qui est l'enzyme dégradant naturellement le

GLP-1. Le Dulaglutide, actuellement développé par Lilly, ne nécessite par exemple qu'une administration hebdomadaire.

- Les gliptines ou inhibiteurs des DPP-4 : ils vont inhiber cette enzyme à l'origine de la dégradation des incrétines et augmentent donc l'action du GLP-1 endogène. Les molécules que l'on peut citer et qui sont sous forme de comprimés sont le Sitagliptine ou encore le Saxagliptine (14).

- Les inhibiteurs des alpha-glucosidases :

Après absorption, les glucides sont dégradés par les amylases salivaires et pancréatiques en dissacharides puis par les alpha-glucosidases en monosaccharides. Seuls ces derniers peuvent franchir la barrière intestinale pour ensuite former du glucose sanguin. En inhibant cette dernière phase, les dissacharides vont rester dans l'intestin et seront éliminés dans les selles. Ce traitement doit être pris au tout début du repas. On trouve ici l'Acarbose ou encore le Miglitol (15).

Monothérapie

En première intention, la Haute Autorité de Santé (HAS) recommande de prescrire la Metformine seule. Si ce traitement ne permet plus d'atteindre l'objectif glycémique cible, une bithérapie puis éventuellement une trithérapie pourra alors être envisagée, mais toujours sur la base d'une association avec de la metformine ou des sulfamides hypoglycémiantes. L'insuline ne sera elle utilisée que lorsque les traitements oraux et non insuliniques ne permettent pas d'atteindre l'objectif glycémique.

Du fait d'une moindre efficacité, d'un manque de recul sur leur sécurité à moyen et long terme et/ou d'un coût supérieur, les autres traitements ne sont pas recommandés en première intention.

En cas d'intolérance ou de contre-indication à la metformine, il est cependant possible de prescrire un sulfamide hypoglycémiant tout en surveillant la prise de poids et la survenue possible d'hypoglycémies (16).

Bithérapie

Si l'objectif glycémique n'est pas atteint malgré une monothérapie par metformine, l'association metformine + sulfamide hypoglycémiant va alors être mise en place.

En cas d'intolérance ou de contre-indication aux sulfamides hypoglycémiants, d'autres schémas thérapeutiques peuvent aussi être proposés (9) comme :

- association Metformine + glinide
- association Metformine + inhibiteurs des alphaglucosidases
- association Metformine + inhibiteurs de la DPP-4
- association Metformine + analogues du GLP-1
- association Metformine + insuline

Trithérapie

Si l'objectif glycémique n'est toujours pas atteint malgré une bithérapie par metformine + sulfamide hypoglycémiant ou si l'écart par rapport à l'objectif est trop important ($> 1\%$ d'HbA1c) les associations suivantes pourront être mises en place :

- association Metformine + sulfamide hypoglycémiant + inhibiteurs des alpha-glucosidases
- association Metformine + sulfamide hypoglycémiant + inhibiteurs de la DPP-4
- association Metformine + sulfamide hypoglycémiant + analogues du GLP-1
- association Metformine + sulfamide hypoglycémiant + insuline

Insulinothérapie

L'instauration d'une insulinothérapie est réalisée lorsque le traitement par antidiabétique ne suffit plus et doit se faire d'un commun accord entre le patient et le médecin. En effet, il est important que le malade prenne conscience de sa pathologie et de l'importance de son traitement pour être le plus rigoureux possible dans son suivi.

Dans le cas d'une insulinothérapie, la Metformine sera poursuivie ainsi que le sulfamide hypoglycémiant ou le glinide. Les autres molécules seront arrêtées. Dans la plupart des cas la quadrithérapie ne se justifie pas (13).

b- L'insuline

1) Découverte de l'insuline

En parallèle des études menées par des médecins européens pour caractériser la maladie du diabète, on assiste à une avancée majeure au Canada entre 1920 et 1923. Il s'agit de la mise en place du premier traitement par insuline.

En 1920 un chirurgien canadien de 29 ans, Frederick Grant Banting (1891-1941), travaille sur l'hypothèse que le pancréas possède deux fonctions distinctes. La première déjà bien connue est la fonction exocrine, c'est-à-dire la production d'enzymes agissant au niveau du tube digestif sur la digestion. La seconde est une fonction endocrine, ce qui signifie la sécrétion d'une hormone dans le sang. Cette hormone qui proviendrait de la partie du pancréas encore mal connue à l'époque, les ilots de Langerhans, serait capable de réguler la glycémie sanguine.



Figure 4 : Portrait de Frederick Grant Banting (17)



Figure 5 : Portrait de Charles Best (18)



Figure 6 : Portrait de John James Rickard Macleod (19)

Afin de démontrer sa théorie, il va tenter d'extraire et de purifier l'hormone dans le but de l'utiliser pour traiter le diabète. Pour cela il va se procurer, à l'aide de son mentor le Dr John James Rickard Macleod (1876-1935), un professeur renommé de physiologie à l'université de Toronto, un petit laboratoire ainsi que 10 chiens pour les expériences. Il va alors être assisté de Charles Best (1899-1978) un jeune étudiant en médecine de 22 ans, diplômé de physiologie et de biochimie.

En 1921 ils testent les premiers extraits pancréatiques hypoglycémisants obtenus et jusqu'alors nommés « soletine », sur des chiens rendus diabétiques par pancréatectomie. Cependant, les résultats n'étaient pas brillants étant donné le taux important d'impuretés présentes dans cette substance dont la couleur était brune. Le biochimiste James Bertram Collip (1892-1965) rejoint alors l'équipe car il faut isoler une grande quantité d'insuline, mais avec moins d'impuretés. Il va ainsi produire la première insuline raffinée pouvant être injectée à l'homme.

Le médecin roumain Nicolas Paulesco, a isolé en même temps ce principe actif, d'origine pancréatique, capable de baisser la glycémie du chien dépancraté. Mais il ne fera pas d'essai chez l'homme en raison des effets secondaires.

Tous ces résultats sont présentés à la Société Américaine de Physiologie en décembre 1921 où le professeur Macleod déclare : « Nous avons obtenu, à partir du pancréas d'animal, quelque chose de mystérieux et qui, injecté à un chien diabétique, supprime tous les symptômes cardinaux de la maladie. Si cette substance agit chez l'homme, ce sera un grand bienfait pour la médecine. ».

Peu de temps après, toujours en décembre 1921, Léonard Thompson un jeune garçon diabétique âgé de 14 ans, est hospitalisé en urgence à l'Hôpital général de Toronto. Sa glycémie avoisinait les 5 g/L, il était en acidocétose et ne pesait que 30 kg. Les médecins ne lui donnaient que quelques semaines à vivre puisque à l'époque les diabétiques de type 1 finissaient par tomber dans un coma acidocétosique duquel ils ne se rétablissaient pas. En 1922, il est décidé d'injecter à l'homme un extrait pancréatique provenant du veau. C'est Léonard Thompson qui, le premier, reçoit plusieurs de ces injections d'insuline. Son état va alors s'améliorer, son poids augmenter, sa glycémie baisser jusqu'à 1,25 g/L et l'acidocétose disparaît. C'était la première fois qu'une injection administrée à l'homme, depuis 1906 où le Dr Georg Zuelzer avait administré des extraits de pancréas de lapin à des patients diabétiques mais dont la toxicité, probablement due à la contamination bactériologique de ces extraits, était telle qu'il dut arrêter le traitement, fonctionnait.

Figure 7 : Portrait de Léonard Thompson sauvé par ces injections d'extraits pancréatiques (20)



Le terme « insuline », qui provient du latin « insula » qui signifie îlot, a été introduit en 1909 par le médecin De Meyer pour nommer cette substance, nouvellement découverte, produite comme cela est supposé à l'époque, par les îlots de Langerhans. Cette appellation va par la suite être généralisée et c'est toujours celle que l'on utilise de nos jours.

Le prix Nobel de Médecine est décerné en 1923 à Banting et Macleod pour leur avancée majeure dans le traitement du diabète de type 1. Mais Banting juge que Best a aussi joué un rôle important dans les travaux et décide de partager la prime avec lui, Macleod fait de même avec Collip.



Figure 8 : Charles Best et Frédéric Banting avec un chien utilisé dans leurs expériences pour isoler l'insuline le 11 janvier 1922 (20)

L'université de Toronto a par la suite signé un accord avec une société pharmaceutique américaine, Eli Lilly and Co., pour l'aider à produire de l'insuline en quantités suffisantes pour des essais cliniques étant donné qu'aucune société canadienne n'était capable de le faire. Ce partenariat fut bénéfique aux deux parties puisque Lilly est devenue l'un des principaux fournisseurs d'insuline au fil des ans, et sans cette entreprise,

les chercheurs de Toronto n'auraient pas pu procéder aux essais cliniques fructueux de l'insuline, utilisée pour traiter le diabète.

Il faut attendre 1955 pour que le biochimiste anglais Frederick Sanger (1918-2013) décrive précisément la structure chimique de l'insuline. Cette découverte lui permettra de décrocher un prix Nobel. Les chercheurs comprennent ainsi qu'il existe des différences entre l'insuline humaine et les insulines animales jusqu'alors utilisées comme traitement¹.

La qualité de l'insuline produite par extraction ne cesse alors de s'améliorer au cours des années aidé, notamment pour ce qui concerne le rendement et la normalisation des extraits, par le laboratoire américain Eli Lilly and Company.

2) L'évolution des traitements jusqu'à nos jours

Faisant suite aux premières injections administrées à l'homme, de nombreux progrès ont été faits permettant d'améliorer la qualité de l'insuline qui devient très rapidement un médicament commercialisé.

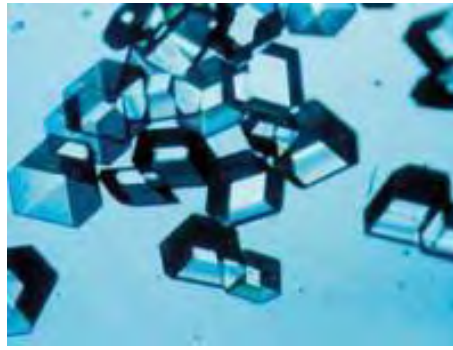
Au début, la première insuline commercialisée, sous forme d'insuline « ordinaire », était extraite de pancréas de bœuf ou de porc, imparfaitement purifiée et sous forme d'une solution acide à pH 3. Le traitement nécessitait 3 à 4 injections par jour.

Le premier objectif fut donc de purifier le produit afin de sécuriser au maximum l'injection puis les recherches, qui continuent encore de nos jours, ont eu pour but d'augmenter l'efficacité du traitement par insuline.

Dans les années 1930, diverses préparations ont permis d'obtenir des insulines à action prolongée afin de diminuer le nombre d'injections quotidiennes, améliorant ainsi de façon sensible les conditions de vie des patients.

Ainsi en 1935, Hans Christian Hagedorn (1888-1971) combine l'insuline à de la protamine ce qui permet de prolonger le temps de résorption sous la peau. Scott et Fisher découvrent eux l'effet retardant du zinc et en 1936 ils mettent au point une insuline à action lente, par adjonction de zinc à de l'insuline protamine. Ce procédé qui induit une cristallisation de l'insuline rallonge encore son temps d'action. Cette insuline est nommée IPZ pour « Insuline Protamine Zinc ». L'insuline contenant uniquement du zinc sera mise au point quelques années plus tard par le Danois Hallas-Moller (21).

Figure 9 : Cristaux d'insuline (1)



En 1946, alors que l'insuline commercialisée se présentait sous la forme d'un produit acide, des chercheurs de l'Institut Hagedorn (Danemark) mirent au point la première insuline dont le pH était neutre. Il s'agit de la NPH pour « Neutral Protamine Hagedorn », une insuline d'action intermédiaire, qui est encore largement utilisée de nos jours.

Frederick Sanger (1918-2013), un biochimiste anglais, décrit pour la première fois la structure biochimique de la molécule d'insuline en 1955. L'insuline est alors la première protéine dont on a pu déterminer entièrement la structure chimique. Il recevra pour ce travail un prix Nobel en 1958



Figure 10 : Portrait de Frederick Sanger (22)

Rosalyn Yalow (1921-2011) a aussi été récompensée par un prix Nobel, décerné une nouvelle fois à des chercheurs travaillant sur l'insuline, en 1977 pour son travail avec notamment Solomon Berson (1918-1972) qui a conduit à mettre au point une méthode de dosage radio-immunologique dans les années 1950. Cette technique permet le dosage précis de substances présentes en infimes quantités dans un milieu liquide. Mise au point initialement pour le dosage de l'insuline dans le plasma des diabétiques, la technique a rapidement été étendue au dosage de multiples substances, peptidiques et non peptidiques. Elle a notamment permis de démontrer que l'insuline extraite du pancréas d'animaux contenait des impuretés et était responsable de la formation d'anticorps dirigés contre l'insuline, à l'origine de réactions allergiques plus ou moins locales ou encore de lipodystrophie.



Figure 11 : Portrait de Rosalyn Yalow et Solomon Berson (23)

Suite à cela, il a été réalisé que la molécule d'insuline était spécifique à l'espèce. Il existait donc des différences entre l'insuline humaine et les insulines animales de porc et de bœuf injectées.

Les laboratoires pharmaceutiques vont ainsi se lancer dans la synthèse chimique de l'insuline afin de pallier aux problèmes de compatibilité rencontrés avec l'insuline animale. En 1965 la synthèse chimique devient possible simultanément aux USA, en Allemagne et en Chine.

En 1978, les laboratoires Eli Lilly réussissent pour la première fois le clonage du gène humain de l'insuline. C'est une étape fondamentale dans la fabrication d'insuline par génie génétique.

La production industrielle d'insuline humaine devient alors possible. Deux méthodes étaient utilisées dans les années 1980 :

- L'hémi synthèse (Novo Nordisk) : l'insuline de porc ne diffère de l'insuline humaine que par un seul acide aminé. En le modifiant par des procédés chimiques on peut alors lui donner la structure de l'insuline humaine.
- La biosynthèse (Lilly) : dans ce cas, on insère le gène humain codant pour l'insuline dans une bactérie ou une levure et, en se multipliant, ces micro-organismes vont produire de l'insuline qui n'aura alors plus qu'à être purifiée. La première insuline produite par biosynthèse a été commercialisée en 1982. Ce procédé de fabrication qui permet de ne plus dépendre d'une source animale, fournit des quantités illimitées d'insuline et est toujours utilisé de nos jours.

Une fois le procédé d'obtention de l'insuline maîtrisé, les laboratoires ont cherché à améliorer les techniques d'injection, en mettant au point par exemple la pompe à insuline en 1980, ou encore à faire varier le temps d'action de l'insuline administrée.

Ainsi, de nombreux travaux sont réalisés afin de modifier la composition de l'insuline, par exemple par le changement d'un acide aminé ou encore par adjonction de radicaux à la molécule d'insuline, dans le but d'en modifier la vitesse et la durée d'action. Ces insulines modifiées sont appelées des analogues de l'insuline.

Il en existe deux types :

- Les analogues rapides (produits dès 1997) : ils agissent plus rapidement que l'insuline humaine mais ils ont aussi une durée d'action plus courte. Ils sont généralement administrés avant les repas en vue d'éviter un pic hyperglycémique. On peut par exemple citer l'Humalog® (Lispro) ou la NovoRapid® (Aspart).
- Les analogues intermédiaires ou lents (mis au point en 2003) : ils vont agir moins rapidement mais auront une durée d'action régulière et prolongée dans le temps, qui peut aller jusqu'à 24h. On appelle couramment « basales » ces insulines qui s'injectent 1 à 2 fois par jour afin de stabiliser la glycémie tout au long de la journée. Parmi les intermédiaires il existe l'Umluline NPH® ou l'Insulatard®, tandis que, pour les lentes, on connaît la Lantus® (Glargine), l'Apidra® (Glulisine) et le Levemir® (Detemir).

Par la suite, d'autres voies d'administration ont été testées, comme la voie pulmonaire avec l'insuline inhalée ou encore la voie orale, mais sans grand succès. Cette partie sera développée à la fin de la thèse.

3) Les systèmes d'administration de l'insuline (pompes, flacons, stylos)

En diabétologie, différents dispositifs médicaux peuvent être utilisés pour injecter de l'insuline. A l'origine, il était surtout utilisé un flacon et une seringue mais avec les progrès réalisés pour améliorer la vie des patients, des systèmes moins contraignants ont été mis en place. De nos jours, on trouve ainsi majoritairement des stylos, contenant des cartouches pré-remplis d'insuline et pouvant être jetables ou réutilisables, et des pompes à insuline.

3.1- La pompe à insuline

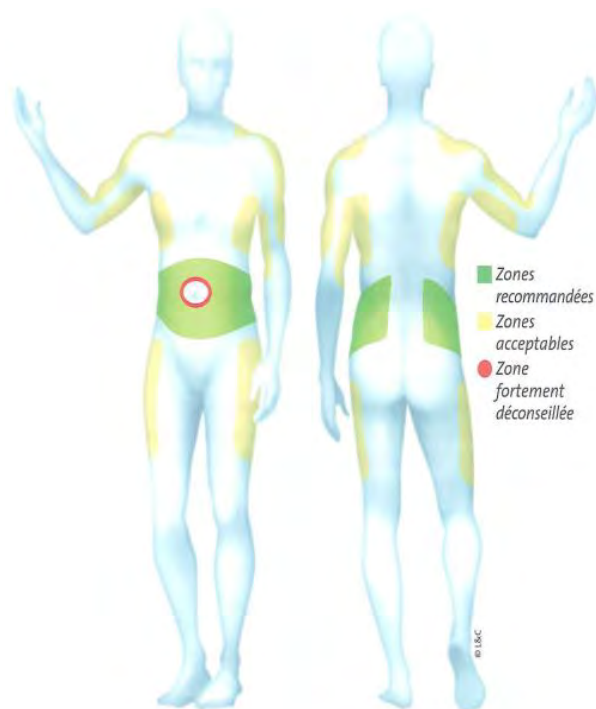
La pompe à insuline est un dispositif médical qui permet d'administrer au patient de l'insuline en continu. Ce taux d'insuline a été déterminé par un médecin diabétologue et correspond aux besoins du patient. C'est une insulinothérapie intensive mais qui ne nécessite pas de multiples injections quotidiennes (24) .

La pompe, qui se présente sous la forme d'un petit boîtier, est composée d'un microprocesseur alimenté par pile, qui permet de programmer exactement les doses d'insuline souhaitées. On y trouve également un réservoir pour l'insuline et une sortie par tubulure qui permet le transport de l'insuline jusqu'au site d'injection via un cathéter. La pompe possède également des systèmes d'alerte avec la vérification de la dose délivrée, un avertissement en cas de cartouche vide ou de pile faible. Cependant, le meilleur reflet du fonctionnement de la pompe reste le taux de glycémie.

La pompe, qui est installée pour une durée de 4 ans, est portée sur soi en permanence mais peut quand même être retirée pour de courtes périodes afin de prendre une douche ou de permettre la baignade (25). Elle libère continuellement de l'insuline rapide mais permet également d'administrer si besoin des doses supplémentaires, sous forme de bolus, sur commande du patient. En effet, la pompe à insuline tente d'imiter le fonctionnement du pancréas en libérant des doses d'insuline tout au long de la journée, mais à la différence de l'organe, elle ne va pas ajuster la quantité administrée en fonction de la glycémie du patient. L'utilisateur doit donc quand même surveiller de près sa glycémie et son alimentation afin de programmer les doses au plus juste des besoins réels et éviter ainsi tout risque d'hypoglycémie ou d'hyperglycémie.

Le site d'injection peut varier et va dépendre du choix et des spécificités du patient. En effet, certaines zones sont plus propices que d'autres à l'installation du système et à l'absorption de l'insuline administrée. Il convient de varier le site d'injection pour éviter le risque de lipodystrophie mais en conservant la même zone par heure d'injection afin d'éviter les variations d'absorption liées au site.

Figure 12 : Schéma présentant les zones d'administration recommandées (24).



Le cathéter qui est constitué d'une tubulure reliant le réservoir à insuline et d'une canule souple permettant l'injection est à changer régulièrement, généralement tous les 2-3 jours pour une question d'hygiène et de prévention des contaminations. Ce système s'insère dans le tissu sous-cutané par le biais d'une aiguille, qui une fois le matériel en place, s'enlève pour ne laisser que la canule souple en Polytetrafluoroethylene, un matériau bio-compatible, en contact avec la zone d'injection.

Il existe deux types de cathéter : le cathéter droit qui s'insère à 90° et le tangentiel qui permet d'adapter l'angle de l'aiguille (24).

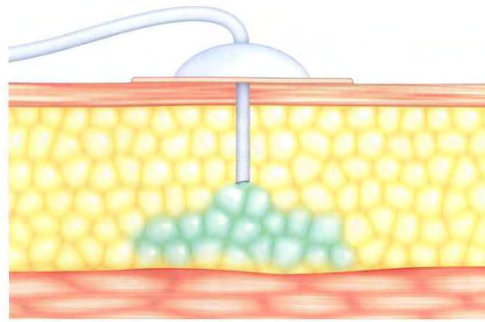


Figure 13 : Représentation d'un cathéter droit (24)

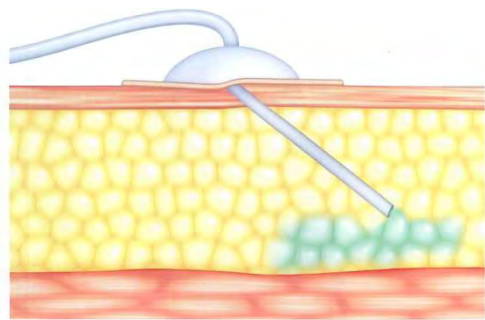


Figure 14 : Représentation d'un cathéter tangentiel (24)

On peut voir ici un exemple de pompe à insuline avec sur l'écran l'ensemble des informations nécessaires au patient pour bien contrôler sa glycémie. On retrouve ainsi le débit de la pompe, la quantité restante dans le réservoir, l'heure et l'état des piles (26).



Figure 15 : Exemple de pompe à insuline

Illustration d'une pompe à insuline en place au niveau de l'abdomen avec la pompe simplement attachée à la ceinture ce qui permet un transport facile et un encombrement faible (27).



Figure 16 : Pompe à insuline implantée

La pompe à insuline est un dispositif médical présentant un certain nombre d'avantages par rapport notamment aux stylos injecteurs (28) :

- Une perfusion continue et régulière d'insuline, qui mime la sécrétion pancréatique et permettant un meilleur contrôle glycémique en limitant les variations glycémiques.
- Elle permet une plus grande souplesse concernant les horaires et une meilleure flexibilité du mode de vie.
- Elle offre une meilleure qualité de vie en limitant les injections et en permettant de ne pas penser en continu au traitement.
- Elle ne nécessite qu'un seul site d'injection pour 3 jours.
- L'absorption d'insuline est plus régulière et s'applique aussi la nuit ce qui permet la correction du phénomène de l'aube (processus naturel qui au petit matin lors de la sécrétion de différentes hormones provoquant une augmentation de la glycémie pouvant induire une glycémie élevée au réveil).

Ce dispositif médical présente cependant aussi des inconvénients, mais qui peuvent être réduits en prenant son traitement au sérieux (25). On peut citer le risque d'infection si la canule n'est pas changée à la fréquence recommandée ou dans de bonnes conditions (par exemple utilisation d'une mauvaise technique ou absence de désinfection de la peau), ou encore une interruption inattendue de la sécrétion d'insuline. Un pli au niveau de la tubulure, une cartouche d'insuline vide non remplacée ou une pile usagée peuvent interrompre brutalement l'administration du traitement et induire rapidement une hyperglycémie voire même une acidocétose diabétique si le patient met trop de temps avant de s'en rendre compte. Pour éviter ces problèmes mécaniques il existe des alarmes au niveau des pompes qui permettent de détecter toute variation anormale du débit.

3.2- Le stylo-injecteur

Le stylo-injecteur, d'apparence semblable à un gros stylo, est un moyen simple d'administration sous-cutanée de l'insuline qui est de plus en plus utilisé. Contenant une cartouche d'insuline, il permet très simplement d'ajuster la dose et de se l'auto-administrer à l'aide d'une aiguille (29).



Figure 17 : Exemple de stylo-injecteur au design discret (modèle HumaPen Luxura HD de Lilly) (30)

Il existe deux types de stylos-injecteurs :

- Les stylos rechargeables et donc réutilisables, qui sont destinés à recevoir des cartouches pré-remplies d'insuline. Ce sont des dispositifs médicaux.
- Les stylos jetables, à usage unique sont pré-remplis et la cartouche ne peut pas être changée. Ce sont, à la différence des précédents, des médicaments disposant d'une autorisation de mise sur le marché.

L'administration nécessite des aiguilles, vendues séparément, et qui devront être changées à chaque utilisation. Il en existe de différents diamètres (0,25 à 0,36 mm) et de différentes longueurs (5 à 12 mm) afin de s'adapter aux besoins et aux spécificités de chaque patient. Avec le temps, la longueur et le diamètre ont considérablement diminué, améliorant ainsi le confort du patient (31).

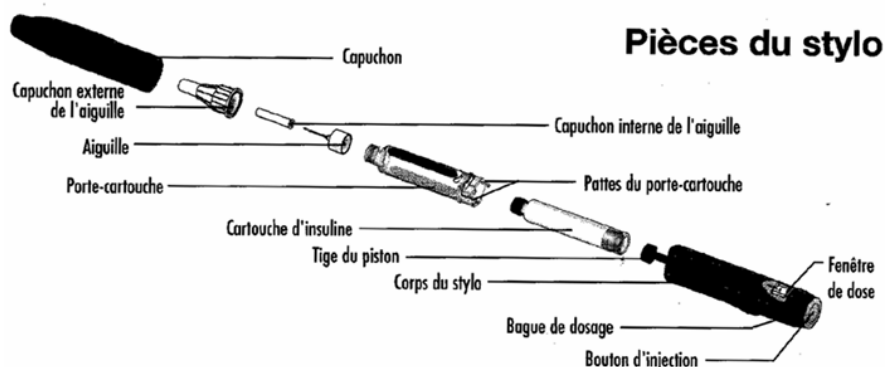


Figure 18 : Schéma des différentes pièces constituant un stylo injecteur (30)

Une fois l'aiguille mise en place, le patient va déterminer la dose à administrer en tournant la bague de dosage. Il pourra ensuite se piquer et appuyer sur le bouton situé à l'extrémité du stylo. Ce bouton permet de décupler la force exercée par le patient pour faire glisser le joint de piston le long de la cartouche et ainsi éjecter la quantité voulue d'insuline. Le but des industriels est de rendre la force à appliquer sur le bouton la plus faible possible pour faciliter l'injection et la rendre accessible à tous les types de patients (femmes, enfants, personnes âgées, etc.).

En fonction du nombre d'unités d'insuline à injecter, le médecin aura le choix entre différentes marques et plusieurs types de stylo-injecteurs. La graduation peut varier de 2 en 2 ou de 1 en 1 ou même par demi-unité selon les laboratoires. Il faudra donc choisir le modèle adapté à l'usage du patient. De même, la taille du cadran indiquant la dose, la force requise pour effectuer l'injection ou encore le matériau dans lequel est fabriqué le stylo, ayant un impact sur son poids, sont autant de facteurs à prendre en compte.

Le stylo présente lui aussi des avantages par rapport aux autres systèmes d'injections (31) :

- Il est facile à transporter de par son poids et sa taille et s'avère très discret surtout au travail.
- L'injection est très rapide, la cartouche d'insuline est déjà en place prête à être utilisée, il suffit alors simplement de mettre l'aiguille en place, de sélectionner la dose, de désinfecter la peau et d'injecter.
- Le dosage est très précis puisqu'il est facilement possible de sélectionner la quantité à injecter en tournant la molette ou le cadran, même pour des personnes chez qui la dextérité est réduite.

Cependant, si la quantité journalière d'insuline nécessaire est très importante, le stylo peut s'avérer très onéreux, surtout qu'il y a des pertes lors de l'amorçage du stylo avant chaque injection et des résidus au fond de la cartouche. De plus, tous les types d'insulines ne sont pas disponibles sous cette forme et il est impossible de réaliser des mélanges (31).

3.3- La seringue et le flacon

La seringue est le troisième grand moyen d'administration sous-cutanée de l'insuline. C'est aussi le plus utilisé à travers le monde, ce qui est certainement dû à son très faible coût.

Il en existe de différents formats avec des contenances et des calibres d'aiguilles différents. Elles sont souvent vendues à l'unité, sont faciles à utiliser et permettent l'injection de la plupart des insulines. Elles sont aussi indispensables pour les patients chez qui un mélange d'insulines est nécessaire, afin de ne réaliser qu'une seule injection.

Grâce aux améliorations apportées à ce dispositif médical, les aiguilles sont devenues fines et courtes, affûtées et elles glissent bien au travers de la peau. Cela simplifie le processus d'injection et le rend moins douloureux. De plus les seringues sont constituées de très peu de pièces ce qui les rend particulièrement fiables (32).

Lorsque le patient doit réaliser de multiples injections quotidiennes, un des inconvénients mis en évidence est la génération d'un grand nombre de déchets, puisque les seringues sont à usage unique. En effet, la quantité de seringues à détruire peut vite devenir importante d'autant plus qu'elles suivent un processus de destruction sécurisé et coûteux pour éviter toute contamination accidentelle.

Il existe trois volumes qui permettent de s'adapter au mieux aux différents traitements (33) :

- **0,3 ml** : 30 unités avec une aiguille de 8 mm et graduée en demi unités
- **0,5 ml** : 50 unités avec une aiguille de 8 mm
- **1 ml** : 100 unités avec une aiguille de 12,7 mm



Figure 19 : Exemple de seringue à insuline (34)

c. Activité endogène de l'insuline

1) Synthèse

Situés dans la partie exocrine du pancréas, les îlots de Langerhans, ou îlots pancréatiques, ne constituent que 1 à 2% de la masse totale de l'organe. Ce sont de petits amas de cellules tunnés par un très abondant réseau de capillaires sanguins dont le diamètre est compris entre 30 et 300 micromètres (35). Leur nombre très élevé peut varier entre 200 000 et 2 300 000 selon les individus.

Les îlots de Langerhans sont constitués de trois principaux types de cellules endocrines, c'est-à-dire des cellules capables de synthétiser des hormones. On y trouve 20% de cellules A (ou alpha) à l'origine du glucagon, une hormone hyperglycémiant, 70% de cellules B (ou bêta) qui vont synthétiser l'insuline et enfin 5 à 10% de cellules D (ou delta) qui vont produire de la somatostatine, une hormone inhibitrice des fonctions endocrines et exocrines du tractus digestif. Les autres cellules présentes dans les îlots sont en proportions très minoritaires. Au niveau des îlots de Langerhans, les cellules bêta qui produisent l'insuline sont situées au centre tandis que les cellules alpha à l'origine de la sécrétion de glucagon

sont plutôt situées en périphérie. Cette localisation va varier en fonction des proportions et de l'âge.

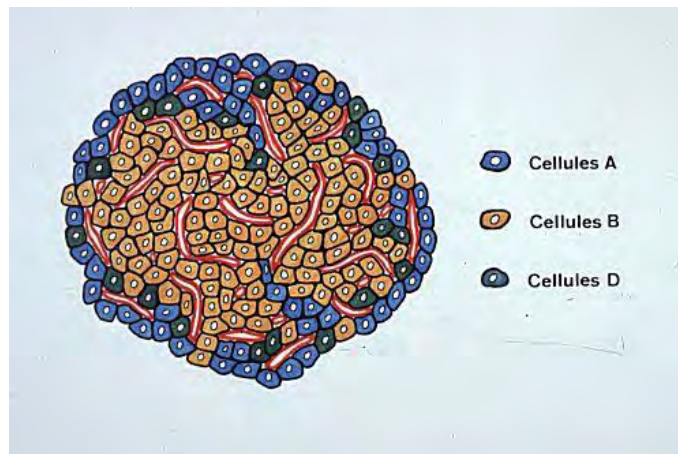


Figure 20 : Représentation schématique des différents types de cellules au sein des îlots de Langerhans (36)

La synthèse d'insuline au sein des cellules bêta implique le clivage successif de ses deux précurseurs, les molécules de pré-pro-insuline et de pro-insuline. Le gène codant pour la pré-pro-insuline est localisé au niveau du bras court du chromosome 11. Une fois synthétisée cette molécule de 98 acides aminés va rapidement subir un clivage enzymatique de 12 acides aminés pour devenir de la pro-insuline.

La pro-insuline, présente dans le réticulum endoplasmique va se replier sur elle-même afin de former par alignement les futures chaînes A et B, entre lesquelles vont apparaître des ponts disulfures pour être liées par le peptide-C (signifiant « connecting peptide »).

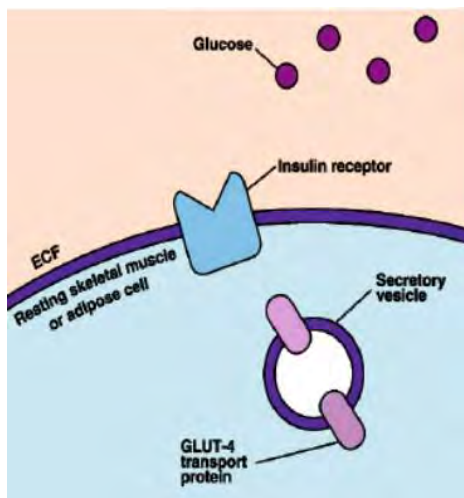
De nombreuses molécules de pro-insuline vont ensuite être stockées sous forme de granules, que l'on appelle bêta-granules, au niveau de l'appareil de Golgi. Celui-ci joue un rôle important d'intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique dans le processus d'exocytose. Les bêta-granules contiennent aussi les enzymes protéolytiques à l'origine du clivage du peptide-C amenant à la formation de bêta-granules matures contenant une quantité équimolaire d'insuline et de peptide-C. Ce peptide assure la liaison entre les chaînes A et B encore inactives, de l'insuline, facilitant sa synthèse, son pliage et son transport dans le réticulum endoplasmique des cellules. Lors de sa libération, devenu actif, il aura des effets sur le flux sanguin micro vasculaire et la santé des tissus. Ce peptide dont l'activité n'a été que récemment découverte, a longtemps été utilisé comme marqueur de la sécrétion d'insuline chez les patients diabétiques.

Les bêta-granules matures forment une très grande réserve d'insuline, bien supérieure aux besoins journaliers.

la structure tertiaire de la protéine et pour la liaison à son récepteur. En biochimie, la structure tertiaire ou tridimensionnelle d'une molécule correspond au repliement dans l'espace de sa chaîne polypeptidique. Ce repliement va conférer à la protéine sa fonctionnalité, notamment par la formation d'un site actif pour les enzymes (40).

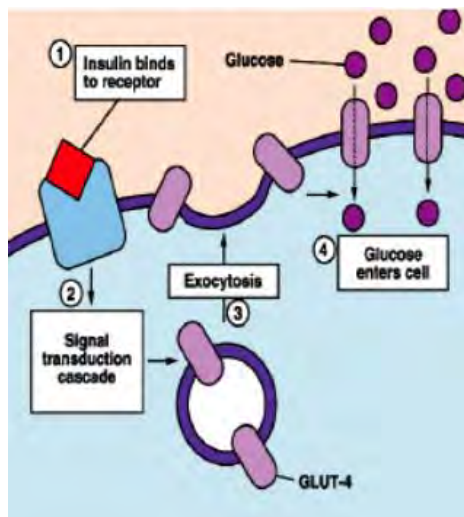
2) Mode d'action

La sécrétion d'insuline par les cellules bêta du pancréas résulte d'une augmentation, physiologique postprandiale ou pathologique, de la concentration sanguine en glucose. Ce glucose circulant va induire la fixation de l'insuline sur ses récepteurs, qui sont principalement situées au niveau des hépatocytes (cellules du foie), des cellules adipeuses et des cellules musculaires. En se fixant sur son récepteur l'insuline active le domaine tyrosine kinase du récepteur à l'origine d'une cascade de réactions qui va notamment amener à la translocation des vésicules de stockage de GLUT-4. En effet, GLUT-4 est un transporteur de glucose qui, dans une cellule non stimulée ou quand la concentration en insuline est faible, est stocké dans des vésicules cytoplasmiques principalement au niveau des cellules hépatiques et musculaires. L'insuline va induire le mouvement des vésicules et leur fusion au niveau de la membrane plasmique. La concentration de ce transporteur insulino-dépendant dans la membrane va alors augmenter.



En l'absence d'insuline, le glucose ne peut pas rentrer dans la cellule et le transporteur GLUT-4 est sous forme inactive.

Figure 23 : Schéma représentant le rôle du récepteur à l'insuline (41)



Après liaison de l'insuline sur son récepteur et fusion des vésicules avec la membrane plasmique le glucose va pouvoir rentrer dans la cellule par diffusion passive.

Figure 24 : Schéma présentant l'effet de la liaison de l'insuline sur son récepteur (41)

L'absorption du glucose dans les cellules se fait par diffusion passive, c'est-à-dire en fonction du gradient de concentration. Elle dépend ainsi de la concentration circulante de glucose ce qui signifie que plus le taux sanguin de glucose est important, plus il y a aura de glucose qui va rentrer dans les cellules.

Une fois dans les cellules, le glucose est rapidement phosphorylé par des enzymes, la glucokinase dans le foie et l'hexokinase dans les autres tissus, pour former du glucose-6-phosphate qui va alimenter la glycolyse (utilisation du glucose comme source d'énergie) ou va être polymérisé en glycogène qui est la forme de stockage du glucose.

L'insuline va avoir un effet sur la glycogénogenèse, c'est-à-dire la formation de glycogène, puisqu'elle va activer la glycogène synthétase permettant sa synthèse et inhiber le glycogène phosphorylase entraînant son utilisation. Elle aura aussi un effet sur la néoglucogénèse (formation de glucose) en stimulant la synthèse protéique, ce qui va entraîner la dégradation des acides aminés qui étaient jusque-là disponibles pour la synthèse de glucose. On assiste donc à une augmentation du stock de glycogène notamment au niveau du foie et à une diminution de la production de glucose au niveau des muscles, du tissu adipeux et du foie.

Selon la localisation de ses récepteurs, l'insuline pourra induire des effets différents sur les cellules. Ainsi, dans les muscles ou le foie, le glucose pourra être utilisé par glycolyse ou stocké sous forme de glycogène, tandis que dans le tissu adipeux, il va entraîner la formation de triglycérides dans les adipocytes.

Il existe différents transporteurs du glucose adaptés aux différentes cellules cibles. Dans la majorité des cas, il s'agit d'un transport passif sauf pour GLUT-2 qui permet un transport bidirectionnel ce qui, dans un sens, nécessite donc un transport actif.

On trouve ainsi (42) :

- GLUT-1 : exprimé dans divers tissus mais à un faible niveau dans le foie et les muscles squelettiques. C'est le principal transporteur du glucose dans les érythrocytes.
- GLUT-2 : exprimé essentiellement dans le foie, les cellules pancréatiques β , les reins et les intestins, il transporte aussi le fructose et le galactose. Il assure le transport bidirectionnel du glucose au travers de la membrane.
- GLUT-3 : exprimé quasi uniquement dans les neurones. De tous les transporteurs du glucose, c'est celui dont l'affinité est la plus forte (K_m faible).
- GLUT-4 : exprimé majoritairement dans les tissus insulino-dépendants comme les tissus adipeux et les muscles squelettiques.
- GLUT-5 : exprimé essentiellement dans les entérocytes et les intestins, il transporte spécifiquement le fructose.

- GLUT-6 : exprimé dans le cerveau et les leucocytes, il transporte le glucose
- GLUT-9 : exprimé en grande partie dans les reins, le foie et le placenta il transporte le glucose à faible vitesse. Il transporte aussi l'urée et le fructose.

La glycémie est une variable qui est régulée par voie hormonale et dans laquelle les hormones pancréatiques jouent un rôle prépondérant : l'insuline a, en effet, une action hypoglycémiante et le glucagon une action hyperglycémiante. Mais le pancréas n'est pas le seul à intervenir dans la régulation de la glycémie puisque l'antéhypophyse par sécrétion de GH et d'ACTH, le cortex surrénalien avec les glucocorticoïdes, la médullosurrénale avec l'adrénaline, ou encore la thyroïde avec les hormones T3 et T4 vont aussi jouer un rôle.

3) Dégradation

L'insuline a une demi-vie courte estimée entre 4 et 6 minutes dans la circulation sanguine après sa libération permettant ainsi une régulation minutieuse du métabolisme. Deux grands processus sont impliqués dans la baisse de la concentration sanguine d'insuline. Le premier est la dégradation de cette hormone, par des enzymes et le second est une baisse de sa sécrétion par un système de rétrocontrôle négatif.

Dans le premier cas, l'insuline circulante est éliminée par le foie lors de son passage dans la veine porte. Le rein joue un grand rôle dans la clairance de la molécule au niveau de la circulation systémique. Cette métabolisation est indispensable puisqu'un défaut de clairance de l'insuline peut provoquer des problèmes de contrôle de la glycémie chez des personnes atteintes de maladies rénales.

D'autres dégradations peuvent survenir au sein de la granule d'insuline, avant sa libération, mais aussi dans d'autres tissus après liaison sur son récepteur. Dans ce cas-là, les complexes « insuline-récepteur à l'insuline » se retrouvent sur la membrane plasmique de la cellule cible où ils s'accumulent au niveau d'invaginations avant d'être internalisés par fusion, dans les endosomes. L'insuline sera ensuite séquestrée et dégradée par voie enzymatique par une ou plusieurs protéases présentes dans la lumière des endosomes.

Le second processus qui consiste en un rétrocontrôle négatif du signal de l'insuline peut venir de la déphosphorylation du récepteur lui-même, ou avoir pour origine la phosphorylation de résidus sérine/thréonine situés au niveau du récepteur. Le rétrocontrôle négatif déclenché par la liaison des molécules d'insuline sur leurs récepteurs a pour objectif d'indiquer à l'organisme qu'il n'est plus nécessaire de produire de l'insuline.

Cette phosphorylation peut être activée par de nombreux acteurs impliqués dans la résistance pathologique à l'insuline, comme un hyperinsulinisme, le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) ou les acides gras libres libérés en excès par le tissu adipeux et transformés dans la cellule en acylCoA (Acétyl Coenzyme A). Les molécules libérées par le tissu adipeux vont pouvoir être à l'origine de l'insulinorésistance hépatique et musculaire présente dans le diabète de type 2 (43).

On distingue deux principales causes d'hyperinsulinisme. La première est une suractivité des cellules pancréatiques synthétisant l'insuline, pouvant être due à un problème génétique, ou bien provenir d'une tumeur pancréatique. Ces pathologies sont à l'origine d'hypoglycémies pouvant entraîner des convulsions, un coma, voire le décès. La seconde forme est due à l'insulinorésistance de certaines cellules et en particulier celles du foie. Cette insulinorésistance induite principalement par le surpoids et le manque d'activité physique oblige le pancréas à produire plus d'insuline pour pouvoir garder une glycémie normale. L'insuline n'arrivant plus à se lier correctement à ses récepteurs va non seulement induire un hyperinsulinisme mais va aussi provoquer à terme, une hyperglycémie qui peut s'installer durablement puisque sans l'action de l'insuline le glucose ne peut plus rentrer dans les cellules. Cela pourrait être à l'origine d'un diabète de type 2.

L'hyperinsulinisme va amener à un épuisement du pancréas qui n'arrivera plus à produire suffisamment d'insuline pour réguler la glycémie. En cas de carence, les cellules ne reçoivent plus de glucose ce qui a pour conséquence une élévation de la concentration du glucose sanguin, jusqu'à arriver à une hyperglycémie.

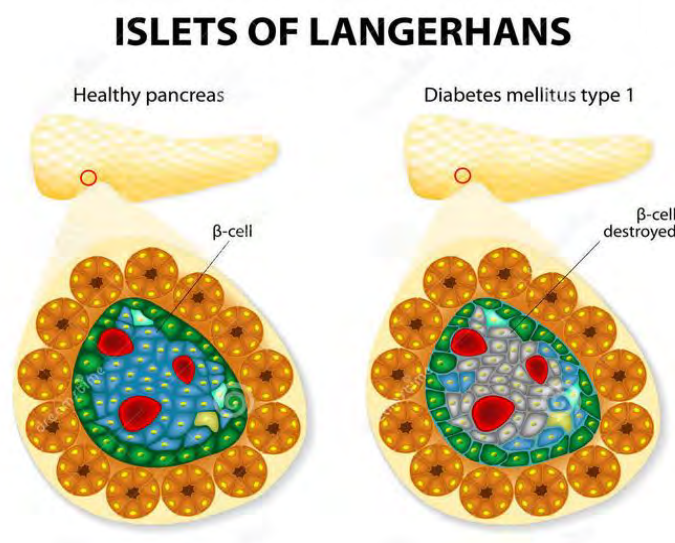


Figure 25 : Schéma présentant les différences entre les îlots de Langerhans d'un pancréas sain par rapport à celui d'un patient souffrant de diabète de type 1 (44)

Dans un diabète de type 1 les cellules bêta du pancréas sont endommagées par le système immunitaire de l'organisme, les empêchant de produire de l'insuline, tandis que dans le diabète de type 2 elles sont rendues inactives par épuisement (44).

Conclusion :

Depuis le premier traitement par insuline d'un patient diabétique dans les années 1920, de nombreuses recherches ont permis de mieux comprendre cette pathologie et le rôle du pancréas dans la sécrétion de l'hormone déficitaire. La description de la structure chimique de l'insuline en 1955 par Frédérick Sander fut le point de départ du développement d'une molécule biogénétique administrable par voie sous cutanée, grâce à différents systèmes injecteurs. Les traitements n'ont alors cessé de s'améliorer pour s'adapter aux différents besoins des patients diabétiques de type I, ou de type II.

2. L'insuline synthétique : des paramètres critiques au cours d'un procédé de fabrication complexe

La molécule d'insuline humaine, administrable dans le traitement du diabète, n'est pas le résultat d'une simple réaction chimique. Sa synthèse par génie génétique demande du savoir-faire du fait de sa fragilité. Par la suite, le procédé de fabrication de l'insuline médicament doit tenir compte de différents paramètres, pouvant dégrader la protéine tout au long des étapes de production. Parmi les paramètres les plus importants, on trouve le pH, les excipients, la température ou encore, la lumière, qui sont des éléments essentiels à contrôler et à maîtriser car leur impact sur l'insuline peut amener à une dégradation plus ou moins rapide et surtout, irréversible. Cependant, d'autres facteurs comme les solvants organiques ou les détergents utilisés au cours du nettoyage du matériel de production, sont aussi à prendre en compte car ils peuvent être facilement négligés et pour autant dégrader le produit.

a- Impacts chimiques sur l'insuline

L'insuline, de par sa nature protéique, est très sensible aux réactions chimiques pouvant survenir lors d'interactions avec son environnement. Ainsi, il est essentiel de maîtriser le pH et de sélectionner avec beaucoup d'attention les excipients de la solution, dans le but de prévenir au mieux les principaux phénomènes de dégradation chimique de l'insuline. Ces différents paramètres seront traités séparément ci-dessous, bien qu'ils soient développés simultanément dans l'industrie pharmaceutique, sous la forme d'un plan d'expérience, afin d'en définir la meilleure combinaison.

1) Influence du pH

1.1- Le pH : définition

La définition du pH est la suivante : « Le potentiel hydrogène, plus connu sous le nom de "pH" permet de mesurer l'acidité ou la basicité d'une solution. Le pH de l'eau pure à 25°C, qui est égal à 7, a été choisi comme valeur de référence d'un milieu neutre. »

Cette mesure de l'état acido-basique d'une solution contenant des ions hydrogène est définie par la formule $\text{pH} = -\log^{10} [\text{H}^+]$, où $[\text{H}^+]$ est la concentration de la solution en ions H^+ .

Le terme de potentiel hydrogène a été utilisé pour la première fois en 1909 par le chimiste danois Soren Sorensen (1868-1939) alors qu'il étudiait le rôle des ions au sein des réactions enzymatiques et notamment celui très important de l'hydrogène.

La valeur de pH d'une solution est directement liée à sa concentration en ions oxonium H_3O^+ qui proviennent de la fixation d'un proton H^+ sur une molécule d'eau ($\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+ = \text{H}_3\text{O}^+$) et en ions hydroxydes HO^- qui proviennent de la perte d'un proton H^+ par une molécule d'eau ($\text{H}_2\text{O} = \text{H}^+ + \text{HO}^-$). Ainsi, dans l'eau, le pH varie de 0 à 14 ce qui permet de définir trois types de milieu.

On trouve :

- Le milieu neutre (ni acide, ni basique) qui correspond à un pH de 7.
- Le milieu acide, correspondant à un liquide dont le pH est inférieur à 7, présente une forte concentration en ions oxonium. Une solution aqueuse est considérée comme acide quand elle contient plus d'ions H_3O^+ que l'eau pure.
- Le milieu basique possède lui inversement un pH supérieur à 7 et se caractérise par la présence d'ions hydroxyde HO^- . Une solution aqueuse est considérée basique quand elle contient plus d'ions hydroxyde que l'eau pure.

Le pH est un facteur logarithmique qui par exemple diminue d'une unité quand une solution devient dix fois plus acide.

Mesurer le pH :

Il existe de nombreuses façons de mesurer le pH d'une solution aqueuse.

La plus simple et la plus connue est l'utilisation d'un appareil appelé pH-mètre. Il est composé d'une sonde de pH constituée de deux électrodes : une standard dont le potentiel

est constant et connu, appelée électrode de référence et l'autre à potentiel variable, en fonction du pH et permettant la mesure, appelée électrode de verre. Une fois l'appareil étalonné à l'aide de deux solutions tampon (en général, l'une acide et l'autre basique, mais le choix des solutions tampons dépendra principalement de la gamme de travail), on peut déterminer la valeur du pH de la solution à analyser par simple corrélation. Son fonctionnement est basé sur le rapport qui existe entre la concentration en ions oxonium et la différence de potentiel électrochimique. Ainsi, en mesurant la différence de potentiel on peut déterminer la concentration en ions oxonium et en déduire la valeur du pH.

Il est aussi possible d'utiliser des indicateurs colorés de pH. Ce sont des substances qui ont la propriété de changer de couleur en fonction de l'acidité ou de la basicité du milieu environnant. Ils sont utilisés dans de nombreux domaines du fait de leur simplicité d'utilisation. Mais ils ne permettent d'avoir qu'une valeur approximative du pH d'où le nom d'indicateurs. Le mélange de plusieurs indicateurs colorés peut permettre d'obtenir un indicateur universel, c'est-à-dire un produit qui change graduellement de couleur en fonction du pH. Cet indicateur universel, très utilisé bien que peu précis, est majoritairement connu sous la forme de papier pH.

Le pH sanguin :

Le pH sanguin est compris entre 7,37 et 7,43. Cette précision nécessite une fine régulation qui est assurée, au sein de l'organisme, par les phosphates. En cas de perturbation de l'équilibre acido-basique, une acidose ($\text{pH} < 7,37$) ou une alcalose ($\text{pH} > 7,43$), peuvent survenir. Le trouble primitif est dû à une augmentation ou à une diminution de la concentration en ions bicarbonate (HCO_3^-) qui peuvent avoir diverses origines (45). On peut notamment citer l'acidocétose qui est une complication aiguë du diabète. Il s'agit de l'acidification du sang par augmentation de la concentration circulante en corps cétoniques. Ces derniers, sont produits par dégradation des acides gras du tissu adipeux pour former du glucose, puisqu'en cas de déficit en insuline le corps ne peut pas assimiler le glucose sanguin. Sans traitement immédiat cette acidocétose peut amener à un coma voire un décès.

Il est aussi possible de noter que les pH veineux et artériels sont légèrement différents. En effet, le pH veineux est légèrement inférieur compte tenu de la concentration en gaz carbonique plus élevée dans la circulation sanguine veineuse qu'artérielle.

Solution tampon :

On parle de solution tampon dans le cas où une solution possède un pH qui ne varie que de manière négligeable si on l'acidifie, la basifie ou la dilue.

Grâce aux solutions tampons et à leur pouvoir de régulation du pH, le corps humain peut maintenir ses différents pH (au niveau du sang, de la salive, de l'estomac, du pancréas, etc.) constants au cours du temps (46).

Le pH d'une solution physiologique (c'est-à-dire isotonique au sang) est de 7,41. C'est donc à ce pH que vont s'intéresser les industries pharmaceutiques pour la formulation et la production de produits injectables ou en contact avec les muqueuses.

Des agents tampons sont essentiels dans la formulation de l'insuline. Pour ce médicament présenté sous forme d'un produit injectable et donc se retrouvant dans la circulation sanguine, le contrôle et la maîtrise du pH sont des éléments primordiaux.

1.2- Impacts du pH sur l'insuline

Comme la plupart des protéines, l'insuline est relativement instable en solution aqueuse. Sa dégradation est majoritairement due à des réactions d'hydrolyses (décomposition par l'eau) ou à des mécanismes de polymérisation (interaction de molécules entre elles pour former des molécules de taille plus élevée). La principale réaction hydrolytique subie par l'insuline est la désamination.

La désamination est une réaction chimique au cours de laquelle une molécule perd un groupement amine ce qui entraîne la libération d'ammoniac (NH_3), une molécule très toxique pour la cellule, et la formation d'un mélange d'isoaspartate et de dérivés d'aspartates (47).

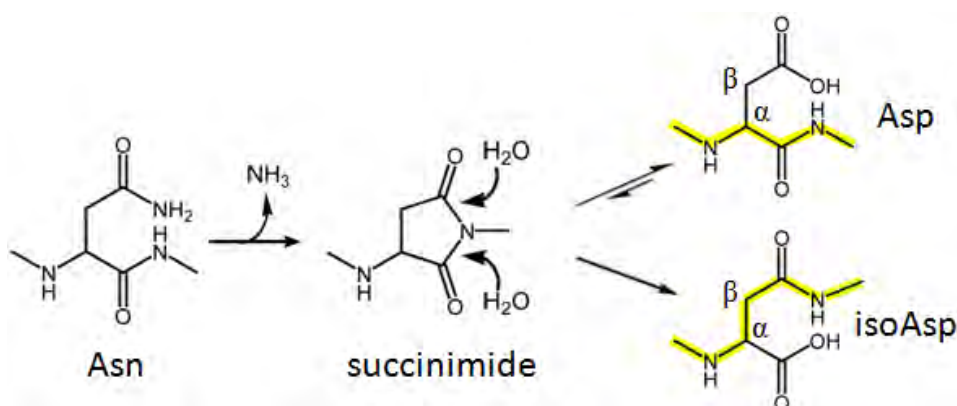


Figure 26 : Réaction de désamination de l'asparagine (48)

L'insuline se dégrade rapidement dans des solutions acides en raison d'importantes désaminations au niveau de l'acide aminé en position 21 sur la chaîne A, qui est une asparagine (AsnA21).

Dans les formulations neutres ou légèrement alcalines la désamination a lieu là aussi au niveau d'une asparagine, mais située cette fois-ci sur la chaîne B (AsnB3) et à un taux sensiblement plus faible. Dans ces milieux, il peut par ailleurs se produire des mécanismes de polymérisation via une réaction de transamination (49). La polymérisation est un procédé par lequel des petites molécules réagissent entre elles pour former des molécules de masse moléculaire plus élevée, via des liaisons covalentes. Dans le cas d'une transamination, on assiste au transfert d'un groupement amine entre deux molécules. La libération de l'espace occupé par l'amine permet en effet la liaison à d'autres chaînes moléculaires et ainsi, la formation d'un agglomérat, également appelé polymère.

Les milieux alcalins vont eux aussi favoriser la polymérisation des molécules d'insuline.

La vitesse d'hydrolyse, en milieu neutre, de l'asparagine située en position B3 n'est pas dépendante de la concentration en insuline de la solution. Elle varie plutôt en fonction du type de formulation de la préparation et de la température de stockage. Ainsi, le taux moyen de cette réaction de désamination lors d'un stockage à 5°C avoisine les 2% par an, mais peut être augmenté en cas de formulation en milieu acide, ou de stockage à température ambiante. Il en est de même avec les réactions de polymérisation, qui seront beaucoup moins rapides à pH neutre qu'en milieu basique, amenant à un taux de dégradation inférieur à 0,5% par an lors d'un stockage à 5°C.

Par contre, si l'insuline se trouve sous forme cristalline, c'est-à-dire formant des molécules ordonnées et stables, la capacité de transformation de l'asparagine décroît de même que la flexibilité de sa structure tertiaire, par rapport aux états amorphes ou solubles (47).

L'insuline recombinante, doit répondre à des critères de pureté. Ainsi, une solution devra contenir un pourcentage bien défini de molécules d'insuline n'ayant pas subi de réaction de désamination associées à une quantité, là aussi maîtrisée, de désamido-insuline. C'est pourquoi, dans la majorité des cas, les préparations d'insuline sont réalisées en milieu neutre afin de diminuer la vitesse de sa dégradation par hydrolyse ou par polymérisation, qui reste inéluctable. En effet, ces importantes réactions de désamination, entraînées par les molécules d'eau, notamment au niveau de la chaîne A, sont largement accélérées en milieu acide, tandis que les phénomènes de polymérisation seront eux particulièrement présents à pH basique.

1.3- Gestion du pH

Pour maîtriser le pH de la solution au cours du procédé de fabrication, il est nécessaire d'intervenir à différents niveaux. Dès la formulation, il est courant d'ajouter un tampon à la préparation, afin d'en stabiliser le pH. Des mesures régulières du pH sont aussi réalisées tout au long des étapes de la production, ainsi que sur des échantillons du lot mis en stabilité, afin d'en vérifier l'évolution au cours du temps. De plus, en cas d'incident ou de modification intervenant au cours du procédé de fabrication, il sera nécessaire d'évaluer l'impact sur le pH.

Monitorer régulièrement le pH de la solution d'insuline tout au long de son procédé de fabrication est donc essentiel, afin de pouvoir l'ajuster si nécessaire, et tout particulièrement au cours de la phase de formulation où l'ajout d'excipients peut amener à d'importantes variations de pH.

2) Influence des excipients

Les différents excipients ajoutés au cours de la formulation d'insuline, que ce soient les conservateurs, les agents isotonisants, les substances tampons ou encore le zinc, vont avoir une influence sur la stabilité chimique mais aussi physique des molécules d'insuline. Le choix de la substance à utiliser doit être minutieux, pour cela différentes formules sont réalisées puis testées avant de convenir de la plus adaptée, n'ayant pas d'impact négatif sur la matière active.

2.1- Les solutions tampons

Comme déjà mentionné plus haut, une solution tampon est une solution dont la composition est telle que son pH varie peu. Ainsi, elle possède la capacité de maintenir approximativement le même pH, malgré l'addition de petites quantités d'ions oxonium ou hydroxyde apportées par des acides ou des bases pouvant être forts, soit par dilution modérée.

Il existe deux types de solutions tampons : soit l'association d'un acide faible AH et de son anion A⁻, soit d'une base faible B et de son cation BH⁺. Au niveau sanguin, un des moyens de régulation du pH est le tampon physiologique composé du couple acide carbonique/bicarbonate (H₂CO₃/HCO₃⁻).

Dans l'industrie pharmaceutique, différents types de tampons peuvent être utilisés. Certains ont un pKa plutôt acide, d'autres neutres ou d'autres encore basiques, et le choix de celui à utiliser dépend entre autre du pH de la solution à formuler. La constante d'acidité Ka, souvent exprimée par son logarithme pKa (avec $pKa = -\log_{10}Ka$), est une mesure

quantitative de la force d'un acide en solution. Elle correspond à la constante d'équilibre de la réaction de dissociation d'un acide dans le cadre d'une réaction acido-basique.

Ainsi, pour un milieu acide le couple acide acétique/acétate de sodium ($pK_a = 4,75$) pourra être utilisé.

Le Tris (abréviation de trishydroxyméthylaminométhane), est un tampon particulièrement convoité dans le milieu des injectables, et notamment pour la fabrication des médicaments du fait de son pK_a de 8,30 à 20°C, qui permet de réguler un intervalle de pH compris entre 6,5 et 9,7. Il est donc idéal pour les formulations à pH neutre. Mais le Tris n'est pas le seul tampon utilisable en milieu neutre puisqu'il existe aussi le tampon phosphate salin, basé sur le couple dihydrogénophosphate / hydrogénophosphate dont le pK_a est de 7,2.

Cependant, le Tris reste majoritairement utilisé car il est simple d'utilisation et peu coûteux, il est aussi appelé tampon de Good (Good's buffer en anglais). Il présente de meilleures propriétés physico-chimiques que le tampon phosphate avec notamment une meilleure stabilité, une plus grande solubilité et, les molécules qui le composent aspirent moins à se complexer. De plus, l'utilisation de tampon phosphate salin au sein d'une formulation d'insuline amène à introduire du chlorure de sodium et du phosphate disodique, qui font partie de sa composition, et qui pourraient alors avoir un impact sur l'isotonie du produit fabriqué.

Le Tris possède donc un avantage certain, ce qui explique sa très large utilisation, mais il est aussi doté de nombreux inconvénients, dont une forte sensibilité à la température ou à la concentration (50).

L'utilisation de tampons au sein de solutions d'insuline neutres, n'ont que très peu, voire pas du tout, d'influence sur les réactions de désaminations pouvant survenir sur les molécules de principe actif (51). Mais la composition du tampon peut lui avoir un effet à d'autres niveaux, il est donc important de prendre en compte tous ces paramètres lors du choix de la formule d'une insuline.

Aspect industriel :

Afin de maîtriser le pH de la solution, des mesures sont réalisées tout au long de la fabrication du médicament, comme expliqué dans le paragraphe précédent (1.3 « Gestion du pH »). De plus, le pH dépend des ratios entre les deux constituants de la solution tampon, c'est pourquoi la maîtrise des quantités est également très importante.

2.2- Les conservateurs

La plupart des insulines commercialisées contiennent du phénol et/ou du métacrésol, qui sont des conservateurs. Leur rôle principal est avant tout d'éviter la contamination microbienne, mais ils auront aussi un impact sur la stabilité de la structure hexamérique, formée par les molécules d'insuline regroupées autour d'un noyau de zinc, en induisant notamment la formation de liaisons supplémentaires entre les chaînes. L'addition de ces nouvelles liaisons, aux précédentes, permet de limiter les réactions chimiques conduisant à la dégradation des protéines d'insuline, en renforçant la structure.

Les conservateurs via différents mécanismes vont être amenés à limiter la dégradation de l'insuline. Premièrement, ces molécules induisent la formation d'un segment additionnel du côté N-terminal de la chaîne B, là où des réactions de désamination pouvaient avoir lieu (en B3 notamment), bloquant ainsi les phénomènes d'hydrolyse à ce niveau.

Ensuite, les molécules de phénol ont la capacité de siéger dans des cavités, au sein de la structure tridimensionnelle de l'insuline, situées entre les dimères lorsque l'insuline est assemblée sous forme d'un hexamère. Le phénol va ainsi former des liaisons de Van der Waals (interactions électriques de faible intensité) entre les histidines situées en position B5, augmentant de ce fait la stabilité de la structure (52).

L'association de phénol ou de ses dérivés à une solution d'insuline permet de diminuer le ratio isoAspartate/Aspartate, ce qui montre qu'un changement dans la structure peut réduire les réactions d'hydrolyse à ce niveau.

L'utilisation de phénol en tant que conservateur induit aussi une baisse de la formation de protéines de haut poids moléculaire, due aux phénomènes de polymérisation, plus importante que le métacrésol ou encore le méthylparabène. Ceci s'explique par le fait que le segment N-terminal de la chaîne B de l'insuline, qui est la principale zone impliquée dans ce type de réactions, se retrouve bloqué à l'intérieur de la structure hexamérique à cause de la formation d'un segment additionnel, sous forme d'une structure en hélice, principalement induite par le phénol (51).

La combinaison de liaisons de Van der Waals, d'interactions hydrophobes et de changements conformationnels favorisés par les conservateurs sont impliqués dans la liaison entre les molécules. Bien qu'ayant une action positive sur les formulations d'insuline, ce ne sont pas des agents neutres puisqu'ils sont à l'origine de réactions chimiques impliquant la protéine d'intérêt. Il est donc essentiel de bien connaître leurs effets sur les molécules d'insuline ainsi que leurs mécanismes d'action afin de cibler et d'aiguiller les

réactions qu'ils induisent dans le but d'en retirer des bénéfices favorables à la stabilité de la préparation.

Aspect industriel :

Il existe des ratios prédéfinis à prendre en compte, puisque la quantité de conservateurs à introduire dans la formulation doit atteindre un minimum pour pouvoir passer les tests des Pharmacopées (exemple du test « Efficacité de la conservation antimicrobienne » chapitre 5.1.3 de la Pharmacopée Européenne version 8.0), mais ne doit pas être trop élevée du fait de leur toxicité. Bien qu'efficace, le phénol peut être nocif à certaines concentrations, il est donc dans la mesure du possible remplacé par du métacrésol. Un autre paramètre à prendre en compte est la perte de produit au cours du procédé de fabrication, tels que lors des purges, ou encore dans les tuyaux (absorption du métacrésol par les tuyaux en silicone).

Il y a donc un compromis à trouver pour atteindre le bon équilibre en termes de quantité à introduire.

2.3- Les substances isotonisantes

Afin de favoriser la tolérance de l'organisme aux substances injectées, il est préférable d'administrer un produit isotonique. Ainsi, les préparations injectables doivent avoir la même pression osmotique que celle du sang, c'est-à-dire la même concentration moléculaire que lui, pour que les hématies y soient en équilibre. L'exemple type est le sérum physiologique qui est une solution aqueuse de chlorure de sodium (NaCl) concentrée à 9 g/L et parfaitement isotonique au sang. Ainsi, pour faciliter l'administration de médicaments, il convient d'injecter une substance la plus isotonique possible par rapport au sang.

Dans l'industrie pharmaceutique, les agents isotonisants ont pour rôle d'ajuster l'équilibre ionique du médicament afin de le rapprocher le plus possible de la concentration moléculaire plasmatique. Les plus couramment utilisés sont le chlorure de sodium, le glycérol et le glucose.

Des études ont montré que des phénomènes de désamination étaient liés à la concentration en chlorure de sodium de la préparation d'insuline. Ainsi, ces réactions d'hydrolyses étaient beaucoup plus importantes en présence de NaCl dont le taux est compris entre 0,2 et 1,5% que lorsque le taux est inférieur à 0,05-0,2%.

Il est donc possible d'utiliser du chlorure de sodium comme agent isotonique dans une préparation injectable, mais il devra être présent en très faible quantité. Si cela ne suffisait pas, il est préférable de le coupler à un second isotonisant que d'en augmenter la concentration (53).

En ce qui concerne l'utilisation de glycérol, il a clairement été mis en avant un effet délétère sur la stabilité chimique de l'insuline en milieu neutre, lorsqu'il comprend des impuretés et surtout des aldéhydes. Il favorise alors, non seulement les réactions de désaminations (notamment en B3), mais aussi la formation de dimères et de polymères. Ces aldéhydes vont réagir avec les groupes amines de l'insuline, formant des bases de Schiff (réaction entre un groupement azoté et une chaîne carbonée), amenant à des liaisons intermoléculaires entre les molécules d'insuline et donc à la formation d'agrégats.

L'association d'un conservateur tel que le phénol ou le métacrésol au glycérol permet notamment de limiter la formation de bases de Schiff en diminuant la mobilité de la partie N-terminale de la chaîne B. L'utilisation de ces derniers en tant qu'agents isotoniques favorise les réactions de désamination et la formation de protéines de haut poids moléculaire, mais peut être contrebalancé par l'effet stabilisant du phénol ou du métacrésol (51).

Selon les concentrations de chaque excipient, nécessaire à la préparation, il peut être intéressant d'étudier différentes associations afin de sélectionner la plus adaptée. Néanmoins l'utilisation concomitante de chlorure de sodium et de phénol semble être la plus efficace en termes de stabilité et de pouvoir isotonique.

Aspect industriel :

L'isotonie des substances injectables est mesurée et contrôlée par des tests d'osmolarité et d'osmolalité.

2.4- Le zinc

L'insuline active se compose d'un monomère, tandis qu'une insuline médicament sous forme neutre, présente majoritairement une structure hexamérique. Pour cela, deux ions zinc sont nécessaires à la formation de chacun de ces hexamères (51).

En effet, l'agrégation d'insuline autour d'un atome de zinc va ainsi générer un hexamère, qui permet la conservation de l'insuline sous forme stable et inactive. Il s'agit aussi d'une conformation physiologique de stockage, qui est notamment retrouvée dans les cellules bêta du pancréas.

Un ajout de zinc, en excès, au cours de la formulation de manière à amener à quatre le nombre de ces ions au sein d'un hexamère, a montré un effet stabilisant sur la structure hexamérique sans pour autant induire de changement au niveau de la stabilité chimique (54).

Il semblerait que ce surplus de zinc renforce la conformation spatiale sans pour autant impacter la flexibilité de la partie N-terminale de la chaîne B, impliquée dans différentes réactions.

A l'inverse, une préparation neutre d'insuline, sans ajout de zinc montre que les molécules d'insuline ne se regroupent plus par six sous forme d'hexamère, mais par trois ou quatre fragments. Le manque d'association en structure hexamérique induit une augmentation de la formation de protéines de haut poids moléculaire, ce qui joue un rôle dans la stabilité de la préparation.

Pour résumer, que ce soit pour assurer la stabilité chimique de la préparation, sa conservation ou sa bonne tolérance par le corps lors de l'administration, les excipients jouent un rôle crucial dans une préparation d'insuline médicament.

Cependant, leur concentration devra être minutieusement contrôlée pour éviter tout effet délétère pouvant nuire au produit, tout comme leur compatibilité avec la matière active sera aussi un point important à vérifier afin de pouvoir assurer aux patients un médicament de qualité.

3) Autres facteurs chimiques

Il existe d'autres facteurs chimiques pouvant dénaturer la molécule d'insuline, c'est-à-dire détruire les liaisons secondaires stabilisant le peptide, pour lui conférer une structure désordonnée. La protéine devient alors insoluble en milieu aqueux.

Il est possible de citer quelques facteurs de dégradation chimique (55).

Tout d'abord, les solvants organiques miscibles à l'eau (exemple : éthanol, acétone, etc.). Dans ce cas, la protéine d'insuline va précipiter car elle est insoluble dans ces milieux. Si le mélange a lieu à température ambiante, la dénaturation de l'insuline sera irréversible, tandis que si la précipitation a lieu à une température inférieure à 0°C, elle sera réversible et la protéine pourra alors retrouver ses propriétés biologiques, une fois le solvant éliminé.

Les sels (association par réaction d'une base et d'un acide) vont eux aussi induire une précipitation de la protéine d'insuline. De même qu'avec les solvants organiques, la précipitation sera irréversible à température ambiante, mais pourra être réversible si elle a été réalisée à froid (< 0°C).

Les acides forts (exemple de l'acide sulfurique ou de l'acide chlorhydrique), de par leur pH très faible, dénaturent complètement les protéines, de manière irréversible, par précipitation suite à la rupture des liaisons salines.

Les détergents anioniques (exemple du sodium-dodécyl-sulfate (SDS)), qui sont parfois utilisés pour nettoyer le matériel, ou les zones de fabrication de l'insuline, peuvent induire une perturbation des liaisons ioniques de manière irréversible.

L'urée est lui aussi un milieu dissociant, comme le SDS, mais dont l'action est réversible après élimination. En contact avec l'insuline il va fragiliser, voire rompre, les liaisons hydrogènes qui sont les principales liaisons de faibles énergies responsables du maintien de la structure de la protéine.

Et enfin, les ions de métaux lourds peuvent aussi avoir un impact négatif sur l'insuline, mais celui-ci est encore mal connu.

Aspect industriel :

Ces éléments ne font pas partie de la formule unitaire de l'insuline. Cependant, les alcools sont utilisés comme agents désinfectants, donc il faut éviter de contaminer l'insuline lors des désinfections. Des réajustements multiples de pH sont également à éviter car ils induiraient la formation de sels. Le rinçage des détergents utilisés dans le lavage du matériel en contact avec l'insuline doit être validé pour éviter la présence de résidus.

b- Impacts physiques sur l'insuline

L'insuline n'est pas seulement sensible à des facteurs de dégradation chimiques. La température et la lumière, qui sont des grandeurs physiques, sont aussi des éléments à surveiller et à maîtriser au cours du procédé de fabrication, de par leur possible impact sur la protéine pouvant être à l'origine d'une dégradation rapide, importante et définitive.

1) Influence de la chaleur sur les protéines d'insuline

Il est bien connu que l'insuline est un médicament thermosensible devant être stocké au réfrigérateur. Cependant, avant de se retrouver sous la forme d'un produit prêt à l'emploi avec des conditions de conservation particulières, les cartouches, flacons ou stylos d'insuline doivent être fabriqués. Il sera donc essentiel de maîtriser la température tout au long du procédé de fabrication.

1.1- Accélération des réactions chimiques pouvant survenir

Au-delà de 30°C, beaucoup de protéines sensibles à la chaleur commencent à être dénaturées, du fait d'une augmentation sensible de la cinétique des réactions. Ces réactions

sont réversibles jusqu'à une certaine limite. La dénaturation d'une protéine résulte d'une modification de sa structure, sans fragmentation de la chaîne peptidique d'acides aminés. La protéine va alors passer par des structures éphémères pouvant aboutir à un dépliement total de la molécule. Cette conformation dépliée peut ensuite rapidement s'associer pour former des agrégats non covalents.

En tant que protéine, il est reconnu que l'insuline est dégradée progressivement au cours du temps par des réactions d'hydrolyse, ou transformée en des composants de haut poids moléculaire, que ce soit pendant ses périodes de stockage ou durant sa période d'utilisation. Cependant, une augmentation de la température engendre au niveau moléculaire une agitation thermique des atomes, à l'origine d'une rupture des interactions intermoléculaires (comme les liaisons hydrogène) stabilisant la structure spatiale. Cette dégradation aura alors un impact sur les propriétés de la protéine avec une baisse de la solubilité par démasquage des groupements hydrophobes, une perte d'activité biologique due à un repliement non actif du site de liaison au récepteur, ou encore une augmentation de la viscosité.

Une exposition thermique de l'insuline peut aussi amener à de profondes modifications, comme par exemple la destruction des acides aminés constituant les chaînes polypeptidiques de la molécule. Une altération des acides aminés soufrés (comme la cystéine ou la méthionine), va amener à produire notamment du sulfure d'hydrogène qui est un gaz toxique. La sérine, la thréonine et la lysine sont elles aussi susceptibles d'être dégradées par la température. Si cette dernière est supérieure à 100°C, il peut survenir des réactions de désamination avec libération d'ammoniac, provenant des groupements «acétamido» de la glutamine ou de l'asparagine (56). A haute température, il est même possible d'assister à la transformation de la stéréochimie des acides aminés avec passage d'un isomère de la série L à un isomère de la série D. La quasi-totalité des acides aminés trouvée dans les molécules du vivant étant de la série L, leur transformation en l'énantiomère D induit une conformation biologiquement inactive.

1.2- Impact de la température sur l'activité de l'insuline

Une étude réalisée en 2009 a comparé l'efficacité, sur la glycémie de lapins, de l'injection d'insulines provenant de trois laboratoires (Eli Lilly, Novo Nordisk et Biocon), après un stockage à différentes températures (57).

Les résultats des expériences ont rapidement montré que les trois insulines possédaient des comportements similaires, dans les mêmes conditions de température. Cela signifie que les résultats obtenus sont propres à l'insuline et ne sont pas dus aux différences de formulation des insulines utilisées.

Une première expérience a permis de montrer qu'il n'y avait pas de différence notable concernant le potentiel hypoglycémiant d'insuline provenant de flacons stockés à 25°C ou 26°C par rapport à de l'insuline maintenue au réfrigérateur à 5°C, pendant la même période de 25 jours.

Après 28 jours de stockage à 32°C et à 37°C, il a pu être mesuré une diminution, comprise entre 14 et 18%, de l'activité de l'insuline contenue dans les flacons. Ainsi, aucune baisse significative du taux de glucose sanguin n'a été relevée chez les lapins ayant reçu une injection d'insuline, provenant de flacons stockés à 32°C et à 37°C, en comparaison, de l'effet observé chez des animaux auxquels il a été injecté de l'insuline conservée à 5°C, pendant la même période 28 jours.

Cette étude a montré que le stockage d'insuline à des températures élevées (32°C et 37°C) amenait après trois semaines à une diminution de son activité, ce qui n'est pas le cas pour de l'insuline stockée quatre semaines à 25°C ou à 26°C.

L'étude citée précédemment permet ainsi de comprendre la décision des laboratoires pharmaceutiques d'autoriser le stockage à température ambiante d'un flacon, d'un stylo ou d'une cartouche d'insuline, entamés, pendant une période de 28 jours. Néanmoins le stockage au réfrigérateur reste la méthode idéale pour entreposer de l'insuline, notamment lorsqu'il s'agit de la conserver sur du long terme avant utilisation.

Par ailleurs, en cas d'impossibilité de stockage à température ambiante inférieure à 25°C, une insuline ne doit être utilisée que pendant une période de 15 jours après ouverture, avant que le processus de dégradation par la chaleur ne survienne et n'entraîne une diminution trop importante de l'activité biologique du principe actif, pouvant induire une inefficacité du traitement.

1.3- Conseils au patient pour une bonne utilisation

Les conditions de conservation de l'insuline sont donc très importantes à respecter puisqu'une insuline mal conservée peut être la source d'une glycémie mal contrôlée.

Les cartouches, les flacons, ainsi que les stylos injecteurs utilisés par le patient pour traiter son diabète, doivent être entreposés au réfrigérateur (entre 2 et 8°C) jusqu'à leur première utilisation, dans la limite de la date de péremption indiquée par le fabricant. Afin d'éviter une douleur à l'injection due au froid, il conviendra de sortir l'insuline une demi-heure avant l'injection. Une fois entamée l'insuline peut ensuite être conservée à température ambiante (en dessous de 25°C) où elle restera stable pendant une période, définie à 28 jours. Il devra ensuite être utilisé une nouvelle cartouche, un nouveau stylo ou un nouveau flacon pour poursuivre le traitement.

On comprend ainsi l'importance de l'éducation des patients aux conditions de stockage de l'insuline, qui est un produit fragile demandant une attention particulière dès les premières étapes de fabrication et jusqu'à son utilisation. Une température et un temps de stockage adaptés sont essentiels pour assurer un maintien adéquat du contrôle glycémique.

1.4- Aspect industriel

Les différentes étapes de fabrication, c'est-à-dire de la phase de formulation jusqu'au conditionnement du produit fini, se déroulent à une température constante d'environ 20°C. Cependant, si cela est nécessaire entre deux étapes (comme entre la fin du remplissage et l'inspection), le produit semi-fini peut être stocké en chambre froide (température de 5°C en moyenne), tout comme il le sera à la fin de l'étape de conditionnement, avant l'expédition.

Le procédé de fabrication est découpé en différentes étapes délimitées par des temps. Ceux-ci correspondent entre autre au temps maximum autorisé hors froid pour le produit. Ces durées sont appelées holding times, et permettent notamment de contrôler l'effet de la température sur le produit. Grâce à cela, chaque étape est limitée en durée, ce qui permet d'assurer un temps total de fabrication n'excédant pas le temps prédéfini, et qualifié comme non dégradant pour le produit.

En outre, les cuves de formulation sont dotées d'une double paroi permettant de faire circuler de l'eau froide, afin de maintenir la préparation à une température relativement basse lors des étapes de fabrication d'autant plus que l'agitation, notamment lors de l'ajout d'excipients, peut entraîner une augmentation de température. Toujours dans le même but, l'eau pour préparation injectable utilisée dans la phase de formulation est froide. Néanmoins, si cela est nécessaire, le dispositif de double paroi permet aussi de faire chauffer la solution.

Une fois l'insuline sous forme de produit fini, la chaîne du froid devra être respectée, et ce depuis le départ du site de fabrication par camions réfrigérés, jusqu'à son utilisation par le patient.

2) Influence du froid

L'insuline devant être conservée au réfrigérateur (entre 2 et 8°C) jusqu'à son utilisation, la plupart des patients pensent qu'elle n'est dégradée que par la chaleur mais pas par le froid. Or, ce dernier est beaucoup plus dangereux pour l'insuline que la chaleur, car lors de la congélation la dégradation du produit est immédiate, tandis qu'avec une augmentation de température l'insuline perd graduellement de son efficacité. Elle doit donc

être protégée contre la chaleur mais aussi contre le froid (températures inférieures à 0°C pouvant amener à la congélation du médicament).

En effet, les basses températures peuvent dénaturer les protéines par dissociation des structures polymériques, amenant le plus souvent à des réassociations non fonctionnelles. Lorsque l'insuline gèle (températures inférieures à -0,5°C) il se forme des cristaux et des agrégats affectant la structure quaternaire des molécules et donc sa conformation spatiale, à l'origine de son efficacité. Il n'y aura pas de réel préjudice physique à l'injection d'une insuline ayant été congelée, mais à cause de la perte de l'activité moléculaire, cette insuline n'aura aucun effet sur la glycémie. Il existe donc un vrai risque d'hyperglycémie à l'utilisation d'une insuline congelée (58).

De manière générale, toute variation anormale de température est nocive pour le produit et entraîne une altération plus ou moins importante. La dégradation d'un produit de santé est d'autant plus dangereuse qu'elle est invisible. Le médicament peut ainsi subir une détérioration progressive par la chaleur, suite à des élévations de température répétées, ou une dégradation par le froid. Cependant, dans ce dernier cas, une exposition unique sous le seuil de congélation suffit puisque dans le cas de l'insuline cela entraîne une inactivation des molécules actives. Il est donc indispensable de maintenir le produit entre +2 et +8°C.

Aspect industriel :

La matière active pure d'insuline se trouve la plupart du temps sous forme congelée avant le début de la formulation. De par l'absence d'excipients et d'eau, les molécules ne sont pas liées et ne forment ainsi pas de structures polymères. La congélation n'a donc à ce stade pas d'effet délétère sur l'insuline. Cependant, une fois en solution, les molécules d'insuline vont se regrouper en hexamères, qui est une conformation stable grâce à leur liaison à des ions zinc mais inactive. Lors de sa dissociation sous forme de monomères l'insuline devient active, mais c'est sous la forme d'hexamères qu'elle sera suffisamment stable pour être conservée. Comme détaillé ci-dessus, les basses températures peuvent dénaturer les protéines en dissociant les structures polymériques formées autour des ions de zinc. Les conformations hexamériques bien définies étant essentielles à la bonne distribution et à l'efficacité de l'insuline, la congélation du médicament va amener à des structures non physiologiques et, il ne pourra ainsi pas se former de molécules actives d'insuline.

Afin d'éviter ces phénomènes néfastes de congélation, les médicaments à base d'insuline sont stockés, en attente des phases d'emballage et d'expédition, dans des chambres froides qualifiées, dont la température est monitorée en permanence et

comportant des alarmes. Il y a donc très peu de risque que ce type de dégradation ne survienne.

Des études sont aussi réalisées afin de définir les conditions optimales de transport et d'expédition. Pour cela, des données sont générées avec différents temps de transport, à différentes températures et leur analyse permet d'établir le cahier des charges qui devra être suivi par la suite. Ces études sont valables autant pour la chaleur que pour le froid.

3) Impact de la lumière

Comme vu précédemment, les protéines sont sensibles à divers facteurs physiques, dont l'exposition lumineuse. Les protéines pharmaceutiques, qui sont majoritairement fabriquées sous forme de liquides injectables et donc conditionnées dans des contenants primaires transparents, sont d'autant plus sujettes à recevoir de la lumière ; ce qui est le cas de l'insuline.

3.1- Réactions chimiques pouvant survenir

Tout d'abord, il faut savoir que tous les rayonnements lumineux ne sont pas identiques. En effet, l'énergie émise par un rayonnement est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde. C'est-à-dire que plus les longueurs d'ondes sont petites, plus l'énergie dégagée est importante. Les longueurs d'ondes les plus courtes, correspondant au spectre de la lumière ultra-violet (UV), sont celles qui auront le plus d'impact sur les protéines et donc sur l'insuline.

Au sein des protéines, ce sont les acides aminés qui absorbent la lumière. Mais quatre d'entre eux sont particulièrement impliqués dans ces phénomènes d'absorbance de par la présence de groupements chromophores au sein de leurs structures. Il s'agit de la tyrosine, de la cystéine, du tryptophane et de la phénylalanine. Il ne sera traité ici que le cas de deux acides aminés les plus importants : la tyrosine et la cystéine.

L'insuline, au cours de son procédé de fabrication, est susceptible d'être dégradée par absorption de l'énergie lumineuse, provenant principalement de la lumière UV, et cela via deux voies majeures. La première est liée à une absorption directe des radiations UV par certains constituants de la molécule, conduisant à la formation d'espèces à l'état excité ou de radicaux. La seconde voie met en jeu des processus indirects faisant intervenir des photo-sensibilisateurs exogènes ou endogènes (59).

Les dommages provoqués par la lumière se traduisent par des perturbations des structures primaire (par exemple l'oxydation de certains acides aminés), secondaire et tertiaire des protéines avec majoritairement la formation de liens intermoléculaires,

l'agrégation des protéines entre elles, ou encore un processus de fragmentation. Cela a donc des conséquences sur l'activité biologique de l'insuline, pouvant amener à sa perte de fonctionnalité. De plus, l'exposition continue aux UV provoque la rupture des ponts disulfures et la formation de dityrosines.

Formation de la dityrosine (impact au niveau de la tyrosine) (60),(61) :

Une étude reportant les effets d'une exposition continue de l'insuline humaine à la lumière UV s'est focalisée sur la photochimie de la tyrosine. En effet l'excitation de l'insuline ayant été faite à 276 nanomètres et à pH neutre, cela correspond à son coefficient d'absorption. L'excitation de la tyrosine vers des états d'énergie plus élevés est à l'origine de différentes réactions. On assiste ainsi à un retour par fluorescence vers l'état fondamental, à la formation d'un état triplet (^3Tyr), à la réaction avec l'oxygène pour former des radicaux peroxy, ou encore à des procédés d'excitation photochimiques ou photo-physiques comme la photo-ionisation.

Cette dernière conduit à l'éjection d'un électron à partir du résidu, ce qui donne un électron solvaté ($e\text{-aq}$) et un radical cation ($^1\text{Tyr-OH}^{++}$). S'en suit une déprotonation entraînant la formation d'un radical non chargé ($^1\text{Tyr-O}^\bullet$).

Ce radical tyrosine ($^1\text{Tyr-O}^\bullet$) peut ensuite être impliqué dans des réactions de liaisons intermoléculaires menant à la formation de dityrosine en position ortho. Plus précisément, les étapes de formation de cette dityrosine sont les suivantes : isomérisation du radical, suivie par une réaction diradicalaire, puis par une énoisation (voir figure 27).

Dans ce cas, la liaison $\text{C}_{\text{ortho}}\text{-C}_{\text{ortho}}$ ayant lieu entre deux tyrosines peut être intramoléculaire ou intermoléculaire ; cette dernière pouvant être à l'origine de l'agrégation des protéines.

Ainsi, la dityrosine est l'un des marqueurs spécifiques de l'oxydation des protéines.

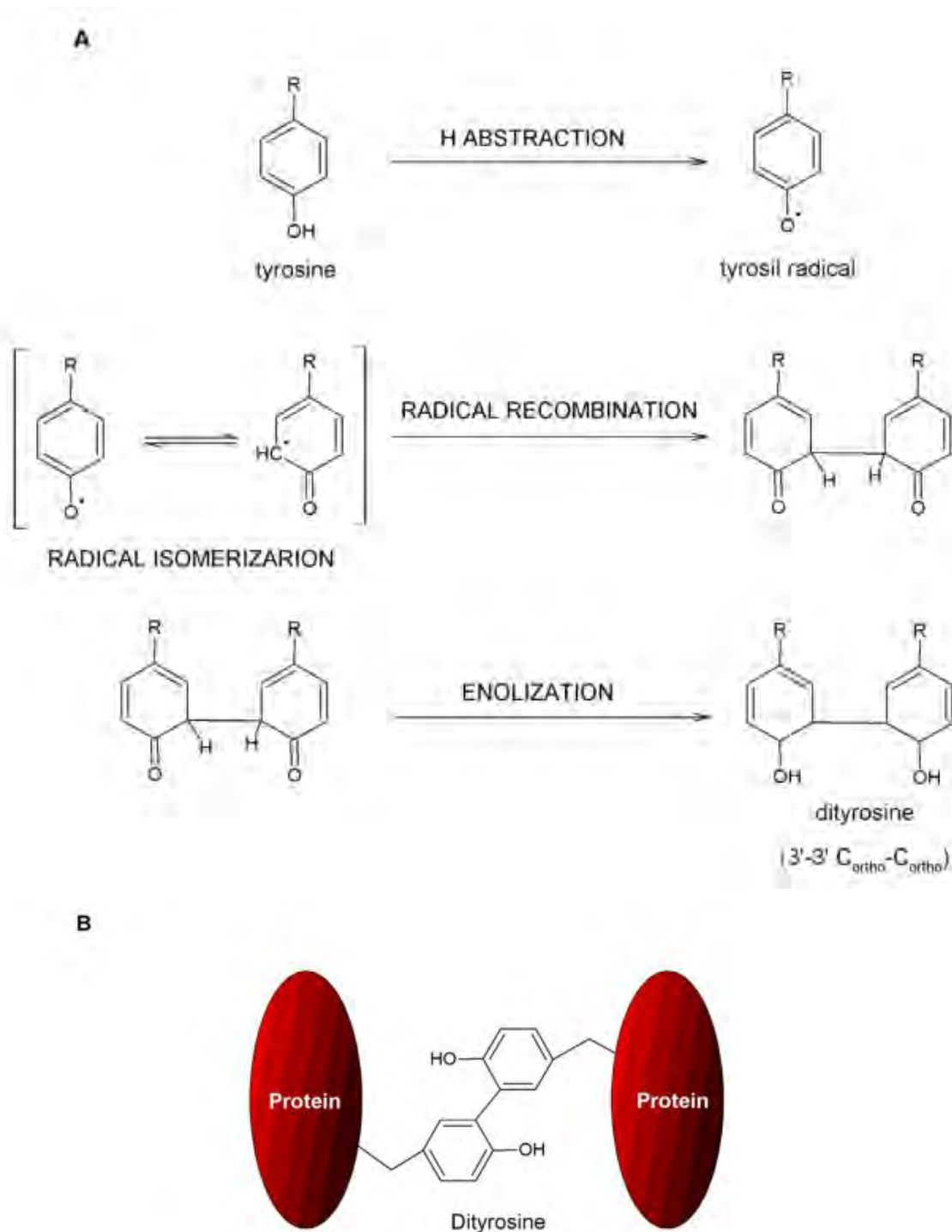


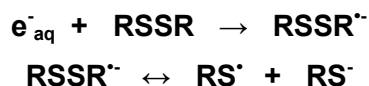
Figure 27 : (A) Mécanismes moléculaires de formation de la dityrosine (C_{ortho}-C_{ortho})

(B) Mécanisme de réaction pour la formation de dityrosine (B) Dityrosine intermoléculaire liant deux protéines (61)

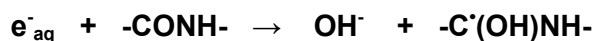
Rupture des ponts disulfures (impact au niveau de la cystéine)(60)_(62) :

Un autre mécanisme photochimique important qui suit l'excitation de la tyrosine est la réduction des ponts disulfures (S-S). En effet, l'électron solvate généré par l'excitation de la

tyrosine peut être capturé par la cystéine pour former un RSSR•- et ensuite casser la liaison disulfure.

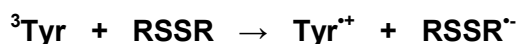


Les électrons solvatés peuvent également interagir avec la chaîne peptidique en créant des ions hydroxydes et des radicaux ketyls qui peuvent se propager le long de la chaîne peptidique.

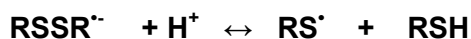


Si un radical ketyl est piégé par un pont disulfure, cela induit la formation d'un radical anion et entraîne la rupture du pont disulfure.

³Tyr peut aussi transférer un électron vers une liaison disulfure proche formant un Tyr•+ et un RSSR•-.



La protonation de l'anion disulfide peut aussi mener à la rupture du pont.



La photolyse de la liaison -S-S- peut également survenir par excitation directe des résidus de cystéine à 254 nm, avec formation similaire d'adduit RSSR•-.

Parmi les principaux mécanismes de dégradation de l'insuline par la lumière, on retrouve la rupture des ponts disulfures et la formation de dityrosine qui sont dus à une exposition continue aux UV. Ainsi, il en résulte une perte des caractéristiques des structures secondaire et tertiaire de la molécule. Par conséquent, la reconnaissance de l'insuline avec ses récepteurs cellulaires sera perturbée, ainsi que son activité biologique.

Les dommages dépendent de la longueur d'onde de la source lumineuse, et sont modulés par l'intensité de celle-ci, le temps d'exposition, la distance avec la source, ainsi que la nature du contenant dans lequel l'insuline est stockée.

La survenue des réactions va également être influencée par la position de l'acide aminé réactif au sein de la molécule et de la conformation de cette dernière. En effet, selon que l'emplacement est caché ou exposé, la dégradation pourra ne pas avoir lieu.

3.2- Protection de l'insuline contre la lumière dans l'industrie

La protection physique complète de l'insuline est le seul moyen de la protéger entièrement de sa décomposition par la lumière. C'est le rôle des contenants primaires et secondaires que l'on utilise pour conditionner le produit fini. Les boîtes en carton par exemple permettent de bloquer les rayons lumineux, et les empêchent d'entrer en contact avec le produit. En utilisant des articles de conditionnement appropriés, on peut donc se prévenir d'une certaine dégradation.

Cependant, avant d'être conditionnée sous forme de cartouche insérées dans des stylos, eux-mêmes insérés dans des boîtes en carton (et donc à l'abri de la lumière), plusieurs étapes de la fabrication exposent la molécule d'insuline à la lumière.

Tout d'abord lors de la formulation de la solution. Généralement les cuves utilisées sont en acier inoxydable opaque, et les formulateurs peuvent regarder, au travers d'un hublot, la bonne dissolution des excipients. Il est donc possible d'instaurer des règles afin que la lampe à l'intérieur de la cuve ne soit pas allumée en permanence. Il est également possible de proposer l'installation de protections opaques au niveau du hublot, pour que la lumière ambiante ne la pièce n'atteigne pas la solution en cours de formulation.

De même lors des étapes de filtration et de transfert vers la cuve de remplissage, il est recommandé d'utiliser des tuyaux opaques ne laissant pas passer la lumière.

Lors du remplissage, les cartouches nues transparentes sont remplies de solution. Ainsi, même s'il est difficile de protéger le produit à ce moment-là, il est possible de veiller à ce que les cartouches remplies soient rapidement stockées dans des boîtes empêchant le passage de la lumière. On pourrait penser à l'utilisation de cartouches en verre teinté, mais la Pharmacopée Européenne ne le recommande pas pour les produits injectables, mêmes photosensibles, à partir du moment où ils nécessitent une inspection visuelle. Le verre transparent borosilicaté préconisé laisse ainsi passer la lumière visible et UV (63) (64).

L'étape de l'inspection visuelle peut elle aussi s'avérer critique, en effet, les cartouches sont mirées par des caméras et les lampes utilisées pour faire ressortir les défauts sont à une très faible distance du médicament. Il faut donc faire en sorte que les flashes lumineux soient les plus brefs possibles.

Enfin, de manière générale entre chaque étape du procédé de fabrication, il est important de veiller aux bonnes conditions de stockage du produit semi-fini et du produit fini : utilisation de boîtes opaques, et chambre de stockage sans lumière, ou équipée d'un temporisateur. La mise en place de systèmes de temporisation des sources lumineuses à chaque fois que cela est possible permet d'éviter le risque de laisser la lumière allumée plusieurs heures et ce, notamment dans les espaces de stockage.

Pour terminer, il est intéressant de préciser que des études sont réalisées, lors du développement du médicament, afin de connaître le taux d'exposition lumineuse maximum au cours du procédé de fabrication, de manière à s'assurer qu'il est inférieur au taux maximum d'exposition, autorisé.

Conclusion :

La formulation d'une insuline est une étape complexe qui demande de bien connaître les excipients, ainsi que tous les produits pouvant entrer en contact avec la matière active. Ainsi, selon les concentrations, certaines substances pourront avoir un effet stabilisant sur la molécule d'insuline, ou au contraire, induire sa dégradation. Les notions de tampons, d'isotonisant ou encore de pH devront donc être maîtrisées par l'industriel, de manière à produire une insuline stable et active. Ainsi, cette protéine est très sensible à son environnement chimique, mais tout autant à des impacts physiques. En effet, l'insuline ne devra en aucun cas être exposée aux rayons directs du soleil, notamment lorsqu'elle est stockée à température ambiante, à une chaleur excessive ou encore au gel, qui pourraient la dégrader de manière irréversible.

3. Quelles évolutions pour le traitement du diabète ?

Depuis la découverte du traitement par insuline dans les années 1920 par Banting et Best, la prise en charge des diabétiques n'a cessé de s'améliorer. Cependant, les recherches qui sont basées avant tout sur le confort et l'autonomie du patient, garantissant ainsi une meilleure observance, donc un meilleur traitement et ainsi une meilleure qualité de vie, continuent et sont orientées vers plusieurs domaines : le développement de nouvelles molécules analogues de l'insuline, l'administration via d'autres voies que la sous-cutanée, ou encore la restauration de la sécrétion pancréatique d'insuline.

a- Les analogues de l'insuline

Un des enjeux dans le traitement du diabète est la capacité à contrôler de manière stricte la glycémie chez les patients. C'est pourquoi, à l'heure actuelle, de multiples injections quotidiennes d'insuline humaine par voie sous-cutanée sont nécessaires. Malgré une amélioration non négligeable de la régulation glycémique, le profil normal des concentrations d'insuline endogène au cours de la journée n'a pas pu être reproduit parfaitement.

Des avancées dans les techniques de génie génétique ont abouti à la mise au point d'analogues de l'insuline, par remplacement d'un ou plusieurs acides aminés de la protéine normale, induisant une modification de sa cinétique et de sa solubilité. En conférant à

l'insuline des capacités d'absorption modulable, à partir du dépôt sous-cutané, il devient possible d'améliorer les profils insuliniques des patients (65).

La rapidité d'action de cette molécule peut être modifiée par l'ajout d'excipients comme la protamine ou le zinc, qui selon les quantités vont induire un relargage plus ou moins rapide de l'insuline dans le sang.

L'agrégation d'insuline autour d'un atome de zinc va ainsi générer un hexamère, qui est une forme de stockage de l'insuline stable et inactive, et qui est notamment retrouvée dans les cellules bêta du pancréas. Physiologiquement, l'exocytose des hexamères d'insuline entraîne leur dissociation quasi-immédiate en monomères actifs. Les solutions d'insuline injectable contiennent pour beaucoup du zinc, permettant de lier la protéine et ainsi de stabiliser le produit. Lorsque l'insuline médicament est injectée dans le tissu sous-cutané, elle se trouve dans des concentrations élevées, ce qui rend la dissociation des hexamères beaucoup plus longue. D'autant plus que les hexamères ou autres polymères d'insuline, du fait de leur grande taille, pénètrent moins bien dans la paroi capillaire que le monomère biologiquement actif. L'absorption d'insuline à partir du dépôt est donc en partie retardée, ce qui explique le délai d'action nécessaire entre l'injection et les premiers effets (66).

La création d'analogues de l'insuline utilise en général des techniques visant à modifier la séquence en acides aminés des protéines. Divers analogues de l'insuline ont été créés suite à des modifications intervenant sur différents acides aminés, avec pour propriété de faire varier la capacité d'auto-agrégation des monomères. Bien que ces modifications de la séquence primaire de la molécule aient pour seul objectif de modifier le profil pharmacocinétique de l'insuline, elles peuvent aussi affecter la structure tridimensionnelle de la protéine, avec pour conséquence une altération possible de ses propriétés biologiques. C'est pourquoi, une étude de chaque analogue est indispensable pour vérifier que la modification réalisée n'a aucune incidence sur les propriétés pharmacodynamiques de l'analogue développé.

Insuline mixte :

Les préparations d'insuline exogène peuvent aussi être pré-mélangées dans le but de réduire le nombre d'injections quotidiennes. Ces insulines mixtes sont les premiers analogues à avoir été mis sur le marché et, contiennent généralement 30% d'insuline classique pour 70% d'insuline NPH (Neutral Protamine Hagedorn). Cet équilibre permet au cours d'une même injection, survenant 30 min avant le repas, de fournir l'insuline basale et le bolus pré-prandial en même temps. Ce type d'insuline est cependant contraignant car peu de déclinaisons existent et elles s'adaptent mal au traitement du diabète de type 1.

Ces préparations sont principalement utilisées chez des patients atteints de diabète de type 2, ne voulant pas entrer dans un schéma thérapeutique complexe, associant les insulines lentes et les rapides.

Pour optimiser l'efficacité de l'injection, et notamment après le repas, des préparations contenant des analogues rapides (lispro ou aspart) ont récemment été développées. Ces nouvelles insulines sont constituées de l'analogue dans une certaine proportion (30%, 50% ou 70%) couplé à de l'insuline protamine (NPH) (65).

Les analogues rapides :

La mise sur le marché d'analogues rapides de l'insuline a pour objectif d'améliorer le contrôle des oscillations glycémiques postprandiales. En effet, ce type d'analogue doit être absorbé le plus rapidement possible, afin d'obtenir un pic de concentration peu de temps après l'injection, mais sa durée d'action doit être brève. Le profil physiologique de sécrétion au moment des repas est ainsi assez bien représenté. De plus, ce type d'insuline permet au patient de se faire une injection au moment même où il commence le repas et ainsi il n'a pas besoin de préparer l'injection trente minutes à une heure avant, avec le risque que l'heure du repas soit décalée et de se retrouver en hypoglycémie. Un autre avantage est dû à la durée d'action qui est relativement courte, ce qui permet d'éviter le pic hypoglycémique pouvant survenir quelques heures après le repas avec une insuline recombinante classique, avec pour conséquence le besoin de s'alimenter et le risque de prise de poids.

Le principal obstacle à l'absorption rapide de l'insuline humaine recombinante injectée provient de sa stabilité sous forme hexamérique lorsqu'elle est administrée en sous-cutané. Le développement d'analogues rapides est ainsi basé sur le fait de réduire la tendance d'auto-agrégation de la molécule (67).

Il existe actuellement sur le marché trois types d'analogues rapides :

- La lispro : c'est le premier analogue à avoir été approuvé et à avoir été commercialisé par le laboratoire Lilly en 1996. La modification intervient au niveau des acides aminés de la chaîne B où la lysine et la proline respectivement en position 28 et 29 ont été intervertis, ce qui a pour conséquence de supprimer le contact existant entre les monomères en position B23 et B28 de la chaîne d'acides aminés. Cette modification empêche la formation de dimères et réduit aussi la force des liaisons hydrogènes ayant pour but de stabiliser les dimères entre eux en vue de former des hexamères d'insuline. Le délai d'apparition de l'activité métabolique est plus court et la concentration au moment du pic plus élevée, pour l'insuline lispro que pour l'insuline humaine. Le pic hypoglycémique

est atteint plus rapidement, en une heure après l'injection, mais pour une durée d'action de six heures au maximum (68).

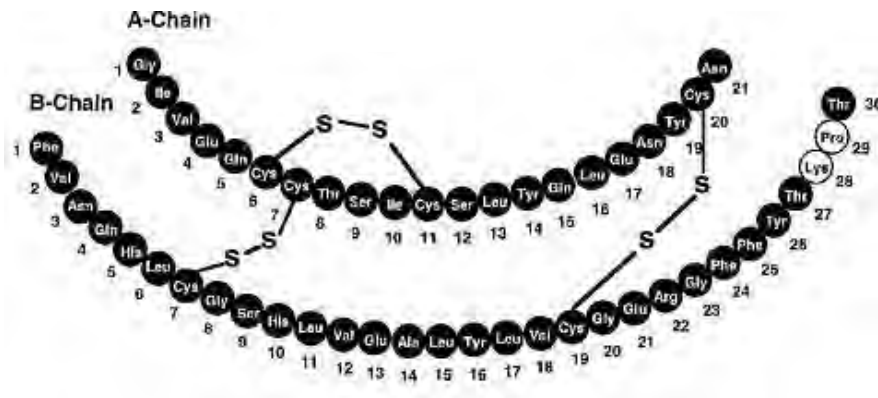


Figure 28 : Schéma d'une insuline lispro (69)

- L'insuline aspart : dans ce second cas, la proline en position 28 de la chaîne B d'acides aminés a été remplacée par de l'acide aspartique (Novo Nordisk). Le premier effet, comme pour l'insuline lispro, est d'éliminer toute interaction entre les monomères au niveau des acides aminés en position B23 et B28. Un second effet est dû à l'introduction d'un groupement carboxyle au niveau de la chaîne B, et donc d'une charge négative supplémentaire, qui aura pour conséquence de réduire encore plus la formation d'agrégats. Le profil pharmacocinétique de cet analogue est sensiblement le même que celui de la lispro (70).

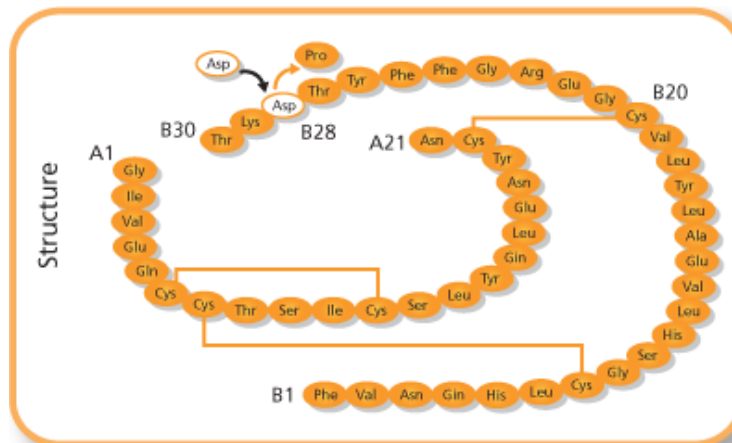


Figure 29 : Schéma d'une insuline aspart (71)

- L'insuline glulisine : développée par Sanofi, elle se distingue par la substitution de l'acide aminé asparagine en position 3 de la chaîne B par de la lysine, et de la lysine en position 29 par de l'acide glutamique. Son mode d'action est similaire aux deux analogues précédents, en limitant la possibilité pour les molécules de former des polymères. Les caractéristiques pharmacocinétiques qui incluent

notamment le délai d'action, sont là-aussi très proches de celles de la lispro ou de l'aspart (72).

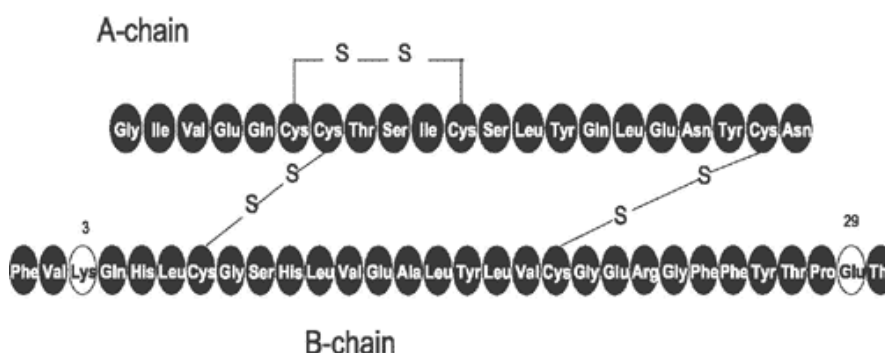


Figure 30 : Schéma d'une insuline glulisine (73)

Des insulines ultra rapides sont aussi en phase de développement au sein des grands laboratoires pharmaceutiques travaillant sur le diabète. Il est possible de citer l'exemple de la BioChaperone® Lispro qui résulte d'un partenariat entre Adocia et Lilly, et pour laquelle des essais cliniques sont en cours. Cette insuline ultra rapide est présentée comme significativement plus rapide que l'insuline lispro, avec un pic d'action 42 min après l'injection contre 1h pour cette dernière et avec un métabolisme lui aussi plus rapide (74).

Ce type d'insuline a donc été développé afin de fournir au patient un traitement à action quasi-immédiate, permettant de limiter les hyperglycémies prandiales, ainsi que les hypoglycémies pouvant survenir par la suite, lorsque l'injection induit son effet. Il pourrait aussi être utilisé dans les pompes à insuline pour avoir une régulation plus précise de la glycémie.

Les analogues de l'insuline basale :

Les analogues rapides de l'insuline ne peuvent pas représenter le seul type d'insuline administrée. Il est essentiel de reproduire précisément chez les diabétiques la concentration de base normale de l'insuline endogène sécrétée.

Les premières préparations d'insuline retard reposaient sur l'addition d'agents retardant tels que le zinc (suspension d'insuline/zinc) ou le mélange zinc/protamine (insuline NPH). L'addition de ces éléments ralentissait la dissociation des polymères d'insuline, retardant et allongeant ainsi leur action. Bien qu'efficaces, ces premières insulines à effet retard nécessitaient généralement deux administrations par jour et ne permettaient pas pour autant d'obtenir un profil totalement dénué de pics d'hypo- ou d'hyperglycémie. L'impossibilité de contrôler l'apparition de pics d'activité peut entraîner des difficultés à

maintenir la glycémie dans une fourchette normale, aboutissant à des épisodes d'hypo- ou d'hyperglycémie, notamment durant la nuit (75).

C'est alors que les analogues de l'insuline basale ont été lancés avec tout d'abord l'insuline glargine, dont Sanofi fut le pionnier, possédant un profil d'action plus plat, sans véritable pic de la concentration plasmatique, et permettant un effet pouvant durer la journée entière. Ce type d'insuline est destiné à couvrir les besoins physiologiques de base en insuline, pendant une période de vingt-quatre heures. C'est pour cela que leur administration peut être faite à n'importe quel moment de la journée, mais par contre tous les jours à la même heure.

Des essais visant à utiliser de la pro-insuline, ou certains métabolites ont échoué, laissant sur le marché seulement deux types d'analogues de l'insuline basale.

On trouve ainsi :

- L'insuline glargine : basée sur le remplacement de l'asparagine en position 21 de la chaîne A d'acides aminés par une glycine, et l'ajout de deux molécules d'arginine au niveau de la chaîne B. Ces modifications induisent la modification du point isoélectrique de la molécule (passant de 5,5 à 6,7). L'insuline est contenue dans une solution acide (pH 4,0) induisant sa cristallisation après injection dans le tissu sous-cutané dont le pH est neutre. Cette forme cristallisée va se désagréger lentement, permettant ainsi une absorption retardée. Les études de pharmacocinétiques montrent une apparition de l'activité entre quatre-vingt-dix minutes et trois heures après l'injection. Elle sera pleinement atteinte après environ six heures pour un temps total d'action supérieur à vingt-quatre heures (76).

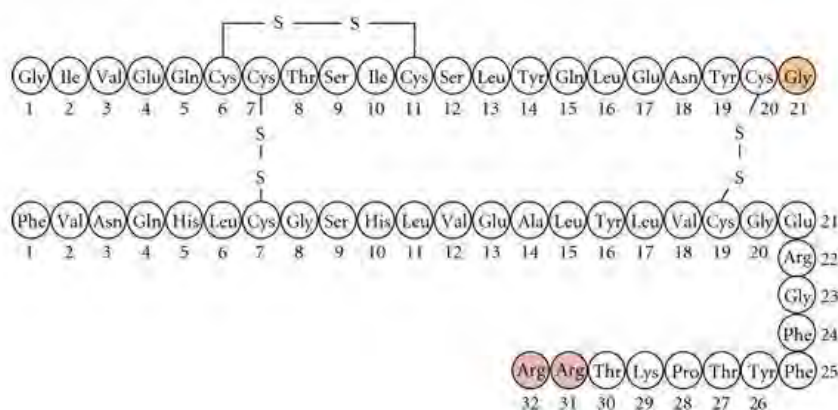


Figure 31 : Schéma d'une insuline glargine (77)

- L'insuline detemir : développée et mise sur le marché par Novo Nordisk, elle se caractérise par l'élimination d'une thréonine en position 30 sur la chaîne B d'acides aminés et par l'acylation de la lysine en position 29, induisant l'ajout d'un

acide gras à quatorze atomes de carbone sur l'acide aminé. L'augmentation du temps d'absorption n'est cette fois-ci pas dû à une cristallisation, puisque la molécule reste sous forme soluble après l'injection, mais à l'ajout de la chaîne d'acides gras qui favorise la stabilité de l'hexamère et permet aussi la formation de di-hexamères. Ces derniers vont interférer avec les molécules d'albumine, se fixant dessus avec un taux supérieur à 98%, ce qui, même une fois les molécules dans la circulation sanguine, rallonge encore le temps d'action de l'insuline detemir. Comme pour l'analogue glargine, l'activité maximale est obtenue environ six heures après injection pour une durée d'action totale avoisinant là-aussi les vingt-quatre heures (78).

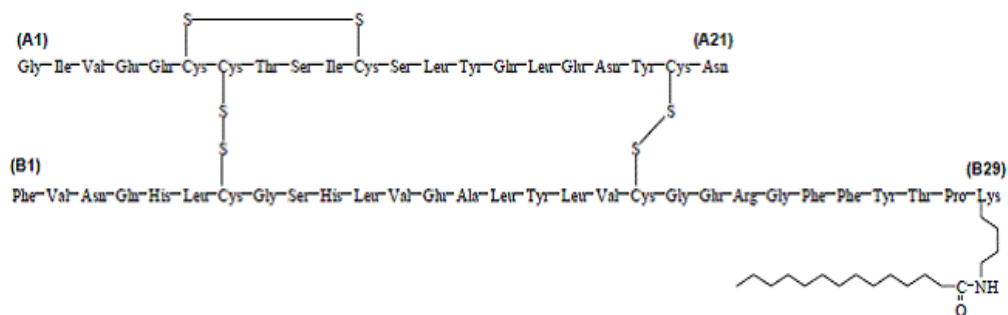


Figure 32 : Schéma d'une insuline detemir (79)

Durant les dernières décennies, la formulation de l'insuline a considérablement évolué, permettant d'obtenir de nos jours un meilleur contrôle de la glycémie chez les patients diabétiques. Le développement d'analogues lents et d'analogues rapides de l'insuline a aussi beaucoup participé à diversifier l'arsenal thérapeutique disponible pour les patients. Ces molécules, actuellement utilisées dans des schémas thérapeutiques précis, reproduisent de façon relativement fidèle le profil sécrétoire physiologique de l'insuline. Grâce à l'affinage des profils de ces insulines, il est maintenant possible d'améliorer l'insulinothérapie, en diminuant aussi les risques liés au diabète et aux variations glycémiques.

b- Les autres voies d'administration de l'insuline

Comme beaucoup de peptides, l'insuline n'est pas absorbée telle qu'elle par le tube digestif en raison de sa dégradation rapide par les enzymes. La voie injectable sous-cutanée s'est ainsi rapidement trouvée comme étant la plus appropriée. Cette voie d'administration, bien que facile d'accès, présente cependant des inconvénients comme le risque de lipodystrophie, d'insulinorésistance, une reproductibilité imparfaite des injections, un risque de dégradation thermique de l'insuline administrée ou encore, le faible rapport concentration/volume.

Le principal obstacle reste néanmoins d'ordre psychologique et n'est autre que la phobie des injections. C'est pourquoi, la recherche s'est orientée vers le développement de formes galéniques alternatives en vue d'une administration par voie orale ou encore pulmonaire.

1) La voie orale

L'insuline reste encore aujourd'hui le traitement le plus efficace utilisé chez les patients diabétiques. Le développement d'une insuline orale offrirait une perspective prometteuse dans le traitement de cette pathologie puisqu'elle permettrait tout d'abord une meilleure administration, par un effet de premier passage hépatique et surtout une excellente acceptation par le patient. En effet, l'insuline physiologique est sécrétée au niveau de la veine porte par les cellules β pancréatiques, ce qui explique qu'une insuline ingérée, passant par le foie, représente un schéma d'absorption intéressant car il se rapproche du processus naturel.

Cependant, comme toute protéine l'insuline est digérée au niveau de l'estomac. L'enjeu est donc de lui permettre d'arriver intacte, c'est-à-dire non dégradée et biologiquement active, pour permettre son absorption et son transport au travers de l'épithélium intestinal. Cela nécessite la mise au point d'un système d'administration fiable, non toxique et reproductible dans le temps.

Les deux contraintes majeures à la prise orale d'insuline sont, tout d'abord sa dégradation au niveau de l'estomac par les sucs digestifs, les enzymes gastriques et le pH acide, avant qu'elle n'arrive sur son site d'absorption. Et ensuite, sa taille puisque la molécule est trop grosse pour parvenir à franchir correctement la barrière intestinale et ainsi passer dans le sang, d'autant plus qu'il n'existe pas de système sélectif de transport de l'insuline à ce niveau.

Avec aussi le risque de muco-adhésion (immobilisation de la forme galénique par le mucus protégeant la paroi intestinale), ou de dégradation par le système immunitaire une fois l'insuline dans le sang, la voie orale semble plutôt être un environnement hostile pour l'insuline.

L'idéal serait de pouvoir associer l'insuline à un vecteur gastro-résistant, afin de la protéger tout au long de son parcours, pour ne la libérer qu'au niveau de sa cible qui est le sang. Ce vecteur, qui devra lui aussi passer dans le sang pour y délivrer l'insuline avec une biodisponibilité suffisante et peu variable, doit, de plus, ne pas déclencher de réactions immunitaires qui entraîneraient son élimination.

C'est pourquoi, les différentes stratégies visant à développer la voie orale reposent notamment sur la protection de l'insuline, des risques d'hydrolyse enzymatique en milieu gastro-intestinal et, sur son transport au travers de l'épithélium intestinal (80).

L'utilisation de promoteurs d'absorptions ayant un effet de perméabilisation de la membrane intestinale a aussi été envisagée. Ainsi la co-administration d'agents comme les sels biliaires ou les acides gras, qui en formant des micelles autour de l'insuline, augmentent la perméabilité de la bicouche lipidique au niveau des cellules intestinales. D'autres promoteurs peuvent aussi par exemple diminuer la viscosité du mucus intestinal ou induire une ouverture locale des jonctions serrées des membranes des cellules. L'augmentation de la perméabilité intestinale via un transport paracellulaire est possible par co-administration d'une toxine (*Zonula Occludens*) avec l'insuline, ce qui va agir spécifiquement au niveau des jonctions serrées, entraînant leur ouverture réversible (81). Malheureusement, l'utilisation concomitante de facteurs chimiques dans la formulation induit une diminution de la biodisponibilité de la molécule, tandis que l'administration d'insuline conjuguée à des oligomères amphiphiles lui fait perdre jusqu'à trente pour cent de son activité.

L'administration d'insuline semble aussi permise en la modifiant chimiquement afin de lui permettre d'utiliser un moyen d'absorption déjà existant, comme le récepteur à la transferrine, présent en grande quantité au niveau de l'épithélium intestinal. Une fois le mécanisme de transcytose effectué, à l'aide de ce récepteur, la molécule serait libérée dans le sang pour produire son effet hypoglycémiant (82).

Une autre approche, consiste en l'utilisation des nanotechnologies avec les techniques de bio-encapsulation. Il devient alors possible d'emprisonner de l'insuline au sein d'un vecteur dont la taille est comprise entre quelques nanomètres et quelques micromètres et ainsi de protéger l'insuline de la dégradation en milieu gastrique et de la véhiculer au travers de la muqueuse intestinale. Cependant, le vecteur qui doit être composé de matériaux biodégradables et biocompatibles, doit être facilement éliminable et ne pas entraîner de réactions immunes, inflammatoires ou toxiques. Le plus souvent les vecteurs utilisés dans l'industrie pharmaceutiques sont constitués de lipides ou de polymères (83).

Ces deux vecteurs représentent des formulations relativement différentes :

- Le vecteur lipidique : son principal atout est son innocuité puisque les lipides sont naturellement présents dans l'organisme. Dans ce cas, la molécule d'insuline est isolée dans un compartiment interne aqueux. Néanmoins, ce système présente un taux d'encapsulation faible, à l'origine d'une perte importante de principe actif lors de sa synthèse. Stables à pH physiologique mais instables à pH acide, ces liposomes sont facilement déstabilisés dans le tractus digestif, ce qui les rend peu performants par voie orale. Pour stabiliser ces particules il existe plusieurs possibilités comme polymériser la bicouche phospholipidique constituant leur paroi, ou les recouvrir d'un polymère hydrophile, ou bien encore sélectionner une

composition spécifique de lipide en fonction du besoin (83). Cette forme lipidique est tout de même intéressante de par sa capacité à promouvoir l'absorption des molécules actives au niveau des muqueuses.

- Le vecteur polymérique : il est plus stable que le vecteur lipidique et peut être formulé à partir de deux types de polymères, naturels ou synthétiques. La structure des particules de polymères dépend du procédé de fabrication, de la nature des matériaux et du caractère lipo- ou hydrosoluble du principe actif utilisé. Il est alors possible de distinguer les nanosphères (matrice de polymère au sein de laquelle le principe actif est uniformément dispersé) et les nanocapsules (système réservoir dont le cœur aqueux ou huileux est entouré d'une membrane polymère). Les polymères synthétiques les plus utilisés sont les poly(cyanoacrylates d'alkyles), les copolymères des acides lactique et glycolique et la poly-ε-caprolactone. Les polymères d'origine naturelle présentant le plus d'intérêt sont souvent des polysaccharides possédant des propriétés gélifiantes. Parmi les plus utilisés, le chitosane, le dextrane, l'alginate ou encore l'acide hyaluronique peuvent être cités. La formulation de ce type de vecteur utilise des conditions opératoires non dénaturantes pour les principes actifs. L'alginate peut former, en présence de cations divalents et en milieu aqueux, des particules gélifiées sensibles au pH. L'utilisation d'alginate pour la délivrance de principes actifs par voie orale en fait un excellent candidat du fait de son comportement en milieu gastro-intestinal. En effet, ces particules sous forme de gel se rétractent à pH acide, protégeant ainsi les principes actifs fragiles, comme l'insuline, de la dégradation dans l'estomac, puis gonflent à pH neutre, libérant alors la molécule active dans le tractus intestinal (83). De plus, des études ont montré que l'administration de nanoparticules d'alginate, recouvertes de chitosane et contenant de l'insuline, permet d'augmenter la biodisponibilité du principe actif d'un facteur quatre par rapport à l'administration du principe actif nu, par voie orale (84).

Un traitement par insulinothérapie doit se rapprocher le plus possible de la sécrétion physiologique, ainsi l'absorption d'insuline par la veine porte est importante afin de stabiliser la glycémie, mais aussi dans le cadre de la prévention des complications à long terme. Une formulation d'insuline optimale passerait donc par le développement d'une forme administrable per os, car non invasive, et respectant un premier passage hépatique. La bonne observance liée à la prise orale d'insuline permettrait de débiter plus tôt l'insulinothérapie et, d'améliorer le contrôle glycémique des patients.

Différentes études menées jusqu'à présent montrent que l'utilisation de vecteurs particuliers permet d'augmenter de manière significative la biodisponibilité de l'insuline administrée par

voie orale. Des plus, des articles scientifiques commencent à montrer des preuves de l'efficacité chez l'animal, mais aussi chez l'homme, de l'administration de médicament par voie orale sous la forme de vecteurs particuliers.

2) La voie pulmonaire

Les premières tentatives visant à passer par les poumons pour administrer de l'insuline remontent aux années 1920. La première étude sérieuse sur l'utilisation de l'insuline inhalée chez l'homme date de 1978. En 1987, des tests complémentaires montrent que l'inhalation d'insuline est une voie d'administration possible et efficace. Le processus industriel fut alors lancé et des laboratoires américains déposèrent les premiers brevets dans les années 2000. Ce n'est qu'en 2006 que la première insuline humaine recombinante, formulée sous forme de poudre à inhaler, a reçu l'autorisation de mise sur le marché en Europe et aux Etats-Unis. Il s'agit de l'Exubera® produit par Pfizer qui fut ensuite retiré en 2008 en raison d'un échec commercial et de la survenue croissante de cancers du poumon chez des patients fumeurs. Des spasmes sévères au niveau des bronches ont aussi été observés.

Il faut attendre 2014 pour que l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (Food and Drug Administration) autorise la commercialisation d'une nouvelle insuline administrée par voie inhalée, grâce à une grande inspiration comme dans le cas des médicaments traitant l'asthme. Indiquée chez des patients diabétiques de type 1 ou de type 2, l'Afrezza® est une insuline de courte durée d'action qui a été développée par le laboratoire MannKindCorporation, mais qui va maintenant nécessiter le soutien d'un laboratoire pharmaceutique plus important pour pouvoir assurer la production à grande échelle.

Etant donné les problèmes soulevés par l'Exubera®, il a donc été décidé de restreindre l'utilisation d'Afrezza® en le déconseillant notamment aux fumeurs et aux patients souffrant d'asthme ou de bronchites chroniques.

La membrane alvéolo-capillaire des poumons offrent une vaste surface permettant d'importants échanges entre le milieu extérieur et le compartiment sanguin (100 à 120 m² de surface alvéolaire pour 70 à 80 m² de surface sanguine). De plus, cette membrane fine (≤ 2 μ m) très vascularisée et comportant très peu d'enzymes est particulièrement propice à l'absorption de l'insuline inhalée en lui permettant une diffusion rapide dans le sang, au moins similaire aux analogues rapides administrés en sous-cutanée. Cette voie non invasive est aussi très facile d'accès (85).

Les molécules d'insuline doivent tout de même franchir quelques obstacles pour pouvoir atteindre la circulation sanguine. On peut ainsi parler du surfactant, qui représente une couche phospholipidique mono-moléculaire et dont les propriétés de tensio-actif bloquent la dissolution des particules solides en les agrégeant. A cela vont notamment s'ajouter l'épithélium alvéolaire et la membrane basale qui constituent autant d'obstacles significatifs à l'absorption moléculaire.

La majeure partie de la dose inhalée n'atteint donc jamais le poumon et environ 15% de la dose totale se retrouve dans le sang. Pour cela, deux mécanismes d'absorptions peuvent entrer en jeu. Le premier, la transcytose, correspond au passage de molécules par inclusion intravésiculaire au travers des cellules épithéliales pour arriver au niveau de l'endothélium afin d'être libérées par exocytose. Il s'agit du mécanisme d'absorption principal de l'insuline par voie pulmonaire. Le second consiste en un passage paracellulaire, c'est-à-dire entre les cellules, au niveau des jonctions ou via des pores résultant de l'altération ou de la mort de cellules épithéliales.

Il existe une importante variation (entre 15 et 30%) de la fraction absorbée pour deux doses administrées chez une même personne. Cette proportion est cependant similaire à celle observée avec l'insuline administrée par voie sous-cutanée.

Divers facteurs physiques, chimiques, physiologiques ou pathologiques, peuvent influencer l'absorption des molécules au niveau de la membrane alvéolo-capillaire. Ainsi, la taille de particules (limitée à 5-6 nm) ou encore leur masse moléculaire (maximum 40kDa) influence la vitesse d'absorption. Cette dernière étant inversement proportionnelle à la masse moléculaire. Certaines caractéristiques physicochimiques comme la lipophilie ou une charge électrique négative favorisent aussi la pénétration moléculaire. Le tabagisme, par altération des cellules épithéliales de la membrane va induire une modification de la perméabilité au niveau des jonctions des cellules alvéolaires, en l'augmentant sensiblement. Cette altération, plus ou moins réversible, est suffisamment importante pour modifier de manière significative la biodisponibilité de l'insuline inhalée, pouvant la multiplier par trois (86). Les pathologies broncho-pulmonaires chroniques (asthme, broncho-pneumopathie chronique obstructive), à l'origine de réactions inflammatoires au niveau des voies aériennes supérieures, ont, elles-aussi, un impact sur la capacité ventilatoire alvéolaire, diminuant ainsi l'absorption d'insuline au niveau pulmonaire (87).

L'insuline inhalée semble absorbée plus rapidement, ou tout au moins aussi vite que l'insuline administrée par voie sous-cutanée. Son effet hypoglycémiant est plus rapide et sa durée d'action n'excède pas les six heures. Malgré une biodisponibilité relativement faible

(environ 10 à 20%), les épisodes d'hypoglycémie sont moins nombreux que lors d'un traitement classique par insuline injectée (88).

Bien que peu de traitement ne fussent commercialisés, de nombreux essais ont été réalisés, basés sur deux types de formulation. On peut citer tout d'abord les dispositifs permettant l'administration d'insuline sous forme de poudres comme Exubera® (Pfizer), Technosphere® (Mannkind Biopharmaceuticals), Spiros device® (Dura Pharmaceutical), ou encore Air® (Eli Lilly). D'autres ont été développés sur la base d'une insuline sous forme d'un liquide nébulisé comme l'AERx® (Novo Nordisk) ou l'Aerodose® (Sunnyvale). Cependant, aucun de ces projets n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché. L'échec d'Exubera® ayant certainement contribué à diminuer l'intérêt marketing des laboratoires pharmaceutiques concernant cette voie d'administration pour l'insuline.

L'insuline est un peptide possédant des propriétés anaboliques (qui favorise la synthèse moléculaire), pro-inflammatoires et immuno-réactives favorisant la multiplication des cellules épithéliales alvéolaires, diminuant l'apoptose (phénomène de mort cellulaire) et induisant une vasodilatation capillaire. De plus, il s'agit d'un traitement censé être administré sur du long terme. Bien que seulement 10% de la dose administrée n'atteigne les alvéoles impactant environ 1% des cellulaires alvéolaires totales à chaque inhalation, la tolérance concernant une administration sur du long terme n'est pas encore connue. En effet, certains excipients pourraient présenter une éventuelle toxicité après plusieurs années d'administration ou pourraient induire des irritations irréversibles. La toux étant le principal symptôme mis en avant chez les patients utilisant ce type de traitement, mais ayant disparu lors de son arrêt (89).

L'insuline inhalée possède un profil d'action similaire à celui de l'insuline à action rapide, administrée par injection sous-cutanée, et pourraient être proposée en préprandial, aussi bien dans le diabète de type 1 que dans celui de type 2, en remplacement ou supplément des traitements classiques (insuline ou antidiabétiques oraux), dans le but d'améliorer le contrôle glycémique. Malgré une forme galénique intéressante et facilitant l'administration, l'innocuité à long terme doit encore être démontrée.

c- La restauration de la sécrétion pancréatique d'insuline

Malgré le développement d'alternatives aux injections d'insuline, comme l'utilisation de nouvelles voies d'administration (orale ou pulmonaire), permettant de rendre le traitement plus confortable pour le patient, ces avancées sont limitées par la fragilité de la molécule d'insuline. Une autre voie de recherche s'oriente ainsi plutôt vers la régénération de la capacité sécrétrice des cellules bêta du pancréas, à l'origine de la libération d'insuline.

1) Le pancréas bio-artificiel

Les avancées récentes en terme d'insuline, de pompes à insuline et de systèmes de contrôle en continu du taux de glucose croisés avec de puissants algorithmes ont permis d'accélérer fortement les progrès dans le développement d'un pancréas artificiel.

Ce concept de régulation par boucle fermée, c'est-à-dire autonome sans intervention du patient, a été pour la première fois proposé dans les années 1970. Le Pr. Alan H. Kadish a ainsi été à l'origine du développement du premier dispositif commercialisable, connu sous le nom de Biostator® (Miles Laboratories Inc.). L'appareil était encore externe au corps et nécessitait un important environnement médical.

Le pancréas artificiel est composé de 3 éléments. On trouve tout d'abord un appareil de mesure en continu de la concentration sanguine en glucose, une pompe à insuline classique avec diffusion sous-cutanée et, un algorithme de contrôle qui calcule en temps réel la quantité d'insuline que la pompe doit délivrer pour maintenir la glycémie dans une fourchette proche de la normalité (90). Cet équipement complexe a pour but de faciliter la vie des patients atteints de diabète de type 1 en leur injectant la quantité exacte d'insuline nécessaire, à l'instant où ils en ont besoin via un contrôle automatique de la glycémie. Il permet ainsi au patient de ne plus avoir à s'injecter des bolus avant les repas ou encore, de devoir ajuster la quantité à administrer en fonction de son activité physique.

Le premier appareil de mesure en continu de la glycémie a été commercialisé en 1999 par Medtronic sous le nom de MiniMed®. La mesure du taux sanguin en glucose était basée sur une réaction enzymatique au niveau d'une électrode, insérée directement dans le tissu sous-cutanée, qui mesurait le peroxyde d'hydrogène dégagé par l'oxydation du glucose par la glucose-oxydase. Ce système n'était cependant pas très fiable et peu précis, notamment concernant les phénomènes d'hypoglycémie épisodique et d'hyperglycémie postprandiale. De nombreux autres systèmes apportant des améliorations ont depuis été mis au point par différents laboratoires, et quasiment tous utilisent finalement encore aujourd'hui ce principe de détecteur ciblé sur les réactions de glucose-oxydation (90).

Le contrôle ininterrompu de la concentration sanguine de glucose sur vingt-quatre heures a montré de nombreux avantages par rapport aux tests glycémiques par piqûre au niveau des doigts avec notamment le fait de générer des informations en continu sur la tendance glycémique, mais aussi en détectant des épisodes asymptomatiques d'hypoglycémie ou d'hyperglycémie. Ce système induit une amélioration significative du taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) chez les patients utilisant ces dispositifs par rapport à ceux

mesurant simplement leur glycémie par prélèvements successifs de sang au niveau digital (91).

De nombreux algorithmes permettant le contrôle de la boucle de régulation glycémique ont été développés ces dernières années. Cependant, il en existe deux principaux : le PID (pour Proportional – Integral – Derivative) et le MPC (pour Model Predictive Control). Il s'agit d'une méthode de contrôle permettant d'effectuer une régulation en boucle fermée d'une grandeur physique d'un système, ce qui correspond ici au taux glycémique sanguin. Ce correcteur est un algorithme de calcul délivrant un signal de commande (augmentation ou diminution de la quantité d'insuline libérée) selon la différence entre la cible et la mesure réalisée.

Ce mode de calcul est basé sur 3 composantes :

- Une action proportionnelle : l'erreur est multipliée par un gain G
- Une action intégrale : l'erreur est intégrée et divisée par un gain T_i
- Une action dérivée : l'erreur est dérivée et multipliée par un gain T_d .

Le réglage d'un PID consiste à déterminer les coefficients G , T_i et T_d afin d'obtenir une réponse adéquate au niveau de la régulation. Cet algorithme doit donc être robuste, rapide et précis (92). La dose d'insuline délivrée correspond à un résumé pondéré de ces trois composantes qui sont au départ déterminées individuellement.

Le second algorithme (MPC), appelé « commande prédictive » en français est une technique de commande avancée ayant pour objectif, via un modèle dynamique du processus de contrôle en temps réel, d'anticiper le futur comportement du procédé. Autrement dit, c'est un procédé permettant d'anticiper les besoins en insulines du corps et d'induire rapidement une réponse aux changements.

Il intègre un modèle physiologique du procédé de régulation du taux glucidique ainsi qu'un second modèle, ne tenant pas compte des variations physiologiques, et basé sur l'étude des relations insuline-glucose. Ce processus permet de prédire des scénarios comme par exemple les variations du taux glucidique liées aux injections d'insuline. Cette capacité de prédiction permet de prévoir une quantité d'insuline à sécréter basée sur une évolution prédéfinie de la glycémie (93).

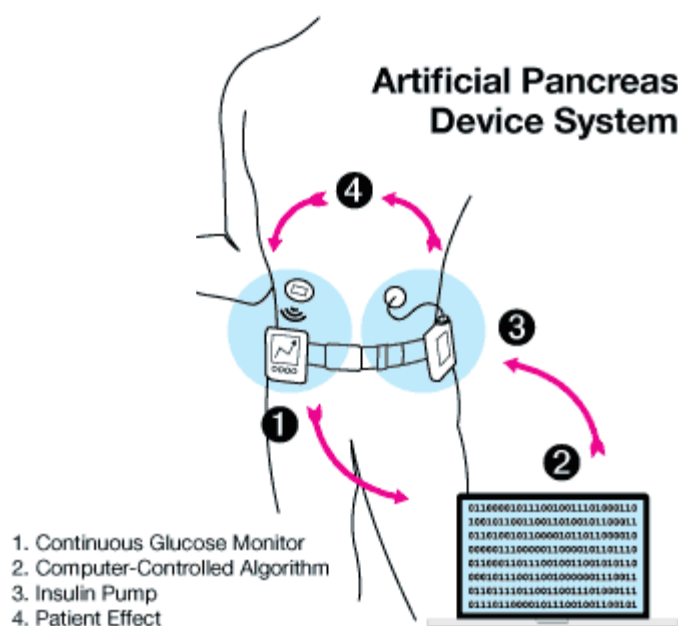


Figure 33 : Schéma représentant un pancréas bioartificiel (94)

En résumé, le système de mesure en continu de la glycémie (1) est un capteur placé sous la peau qui donne en permanence des informations sur l'évolution du taux sanguin en glucose. Cette donnée est obtenue par corrélation avec le taux glucidique mesuré au niveau du fluide interstitiel, c'est-à-dire au niveau du liquide entourant les cellules, là où est implanté le capteur. L'algorithme (2), correspondant à un logiciel informatique basé sur un processeur, pouvant être situé au niveau de la pompe ou de tout équipement électronique externe, va ensuite envoyer des instructions à la pompe, quant à la quantité d'insuline à injecter. La pompe (3) selon les indications reçues, administre de l'insuline dans le tissu sous-cutané, régulant ainsi la glycémie (4), qui change constamment chez le patient en fonction de ses repas, de son activité physique ou encore de son métabolisme.

2) Les greffes d'îlots de Langerhans

Il existe d'autres alternatives thérapeutiques, en cours de développement, aux injections pluriquotidiennes d'insuline qui reste actuellement l'unique traitement du diabète de type 1. On peut ainsi parler de la transplantation d'îlots pancréatiques qui est une technique consistant à isoler et purifier des îlots de Langerhans préparés à partir du pancréas d'un donneur et à les greffer au niveau du foie de patients diabétiques de type 1.

Des études ont montré la faisabilité et l'efficacité de cette nouvelle approche thérapeutique, à l'origine de la restauration d'une production d'insuline par l'organisme du patient diabétique, en vue de réguler la glycémie (95). Cette sécrétion, bien que partielle, résulte de la réactivation des cellules β qui sont les seules cellules de l'organisme capables

de produire de l'insuline. Selon ces études, 98% des patients redeviennent insulino-indépendants immédiatement après la greffe. Cependant, seulement 10% de ces patients le restent cinq ans après la transplantation (96).

Cette greffe d'îlots a pour avantage de pouvoir stabiliser le diabète et de limiter les hypoglycémies sévères en diminuant le traitement par insulinothérapie mais ne permet pas encore d'arrêter complètement un traitement par insuline. Au long terme, on assiste aussi à une perte de fonction des îlots transplantés.

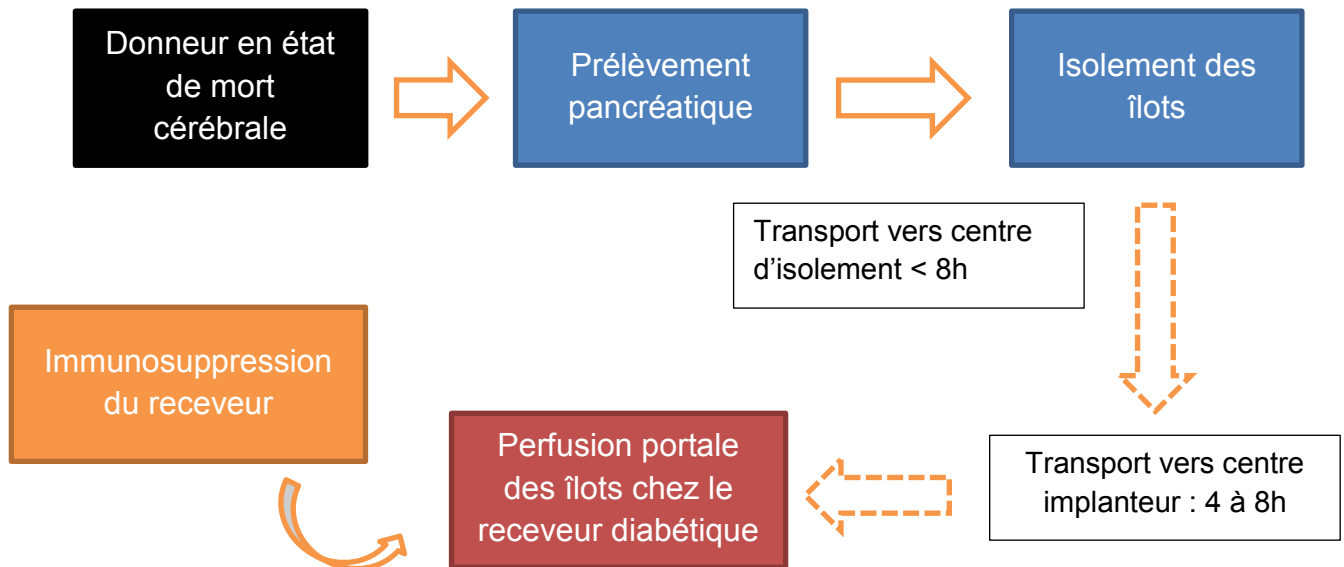


Figure 34 : Schéma présentant le déroulement d'une greffe suite à un don de pancréas.

Une greffe n'est pas un traitement anodin et nécessite une importante prise en charge médicale. Chaque étape demande du savoir-faire et possède son lot de difficultés pouvant faire échouer la greffe.

L'isolement des îlots de Langerhans se fait par digestion pancréatique à l'aide de collagénases. Les cellules recueillies sont ensuite purifiées par centrifugation en gradient de densité. Cette première étape induit déjà la perte d'environ 50% des îlots, auxquelles s'ajoutent une perte due à l'état du donneur ou encore aux conditions de transport, qui peuvent avoir dégradé le pancréas. En moyenne, les médecins vont avoir besoin d'au moins deux pancréas pour pouvoir greffer un receveur.

Avant l'injection chez le receveur, celui-ci subira un traitement par immuno-suppresseur afin de prévenir le rejet de la greffe et d'éviter une agression auto-immune des îlots de Langerhans injectés. Ce traitement induit un risque de toxicité envers les îlots mais aussi et surtout un risque général pour le patient, qui devra vivre sous immuno-suppresseurs, et qui risque alors de déclarer des effets indésirables ou de développer des infections.

L'injection chez le patient diabétique est réalisée par voie transhépatique sous échographie. Une masse de cellules d'environ 5 à 15 mg est perfusée ou bien injectée au niveau de la veine porte. Il existe alors un risque d'hémorragie hépatique, de thrombose ou de perte des îlots (97).

Cette innovation thérapeutique qui a pour but de guérir un jour les diabétiques de type 1 se heurte notamment à une très faible disponibilité de pancréas, à de faibles rendements à l'issue de l'isolement, à une absence de vascularisation des îlots greffés, à une toxicité non négligeable du traitement immuno-suppresseur, à un coût élevé et surtout à une normoglycémie imparfaite et de courte durée.

Grâce à l'utilisation de nouveaux traitements antirejet, des premiers succès ont permis de valider le principe de la greffe d'îlots chez les patients atteints de diabète de type 1 sévère. Cependant, l'épuisement des îlots greffés semble inexorable chez la majorité des patients après la première année, aboutissant à la perte progressive du greffon. La cause évoquée est la réaction immunitaire de rejet du receveur contre les îlots transplantés.

La nécessité d'un puissant traitement antirejet reste donc un frein important. De plus, ces traitements imposent une surveillance régulière pour détecter et traiter rapidement toute complication infectieuse ou tumorale (cutanées en particulier) pouvant survenir du fait de la baisse des défenses immunitaires.

Pour l'instant, le bénéfice observé semble largement compenser les risques liés à la greffe puisque ce traitement améliore grandement la qualité de vie des patients diabétiques, tout en les rendant insulino-indépendants durant quelques années.

Mais il subsiste encore un obstacle à un développement à plus grande échelle, c'est la faible disponibilité de pancréas humains, actuellement issus des dons d'organes (95).

De récents travaux laissent entrevoir la possibilité de produire en laboratoire de grandes quantités de cellules bêta humaines, en particulier à partir de cellules souches embryonnaires.

3) Les cellules souches

Comme vu précédemment, un des problèmes rencontré par la greffe d'îlots est le manque de donneurs. Aussi au lieu d'utiliser les cellules d'un pancréas provenant d'un don d'organe, des recherches sont en cours pour produire des cellules bêta à partir de cellules souches et les utiliser comme traitement de substitution. Les cellules souches pluripotentes sont actuellement représentées par deux grands groupes : les cellules souches embryonnaires et les cellules pluripotentes induites. Elles sont caractérisées par leur prolifération illimitée et par leur capacité à générer les trois couches germinales (endoderme, ectoderme et mésoderme) (98).

En premier lieu, les cellules souches embryonnaires qui sont des cellules dites pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se répliquer à l'infini pour proliférer en culture et se différencier en plus de 200 types de tissus humains. Ce sont les premières cellules produites au niveau de l'embryon et sont à l'origine de tous les tissus du corps.

Ces cellules pourraient donc être différenciées en cellules bêta immatures puis transplantées chez un patient diabétique, en espérant qu'elles arrivent à maturité et produisent de l'insuline. Des chercheurs ont prouvé que c'était possible chez la souris. Ces cellules immatures transplantées se différencient une fois administrées, et sont capables de percevoir le niveau de sucre dans le sang pour y répondre par la production d'insuline (99).

Cependant, ces cellules embryonnaires peuvent être précurseurs de tous les types de cellules et ont ainsi le potentiel de former des tumeurs. Il faudrait donc arriver à encadrer leur différenciation avant de pouvoir réaliser des essais chez l'humain.

Une alternative pourrait être de produire des cellules bêta déjà différenciées et fonctionnelles, afin de les transplanter directement chez le patient. Malheureusement les procédés de différenciation étant extrêmement complexes, ils ne sont pas encore assez bien connus pour pouvoir avancer dans cette voie.

D'autre part, il est possible d'utiliser un autre type de cellules souches pour traiter le diabète. On les appelle les cellules pluripotentes induites et elles sont produites en reprogrammant des cellules adultes, du patient lui-même. Ces cellules pourraient alors être utilisées pour produire des cellules bêta qui seraient par la suite administrées au patient.

Les scientifiques ont montré que certaines de ces cellules productrices d'insulines issues du laboratoire sont capables de réguler la glycémie chez la souris diabétique. Bien que plus stable, les cellules souches induites ont jusqu'ici été moins performantes pour la production d'insuline que les cellules bêta provenant de cellules souches embryonnaires (99).

Ce type de traitement par cellules souches présente un gros avantage puisqu'il pourrait régler le problème du rejet de transplant. En effet, les cellules transplantées étant créées par des cellules provenant au départ du patient lui-même, elles ne seront pas reconnues comme étrangères par le système immunitaire. Il subsiste néanmoins un risque, correspondant au problème originel du diabète de type 1 et qui est une réaction auto-immune du corps contre les cellules bêta de l'organisme.

Par ailleurs, certains chercheurs pensent qu'il serait possible de stimuler des cellules souches déjà présentes dans le pancréas du patient afin de produire de nouvelles cellules bêta. Ces cellules qu'il faudrait arriver à identifier, présentent certaines propriétés des véritables cellules souches mais elles n'ont pas la capacité de s'auto-renouveler indéfiniment (100).

Développer des méthodes de production des cellules bêta n'est pas le seul axe de recherche à considérer, il faut aussi s'assurer de la survie des cellules après transplantation. Comme le diabète de type 1 implique la destruction des cellules bêta par le système immunitaire de l'organisme, les recherches en cours étudient aussi comment protéger les cellules transplantées. On pourrait aussi les implanter au sein d'une capsule protectrice, ou plus simplement dans une partie du corps moins sensible au système immunitaire, ou encore, utiliser des cellules souches de la moelle osseuse du patient pour rééduquer le système immunitaire de manière à ce qu'il ne s'attaque plus à ces cellules sécrétrices d'insuline. Le but étant d'empêcher le système immunitaire de détruire les cellules transplantées sans faire usage de médicaments immunosuppresseurs.

Des chercheurs ont montré qu'il était possible de transformer certaines cellules du pancréas : les cellules alpha en cellules bêta. Pour cela, ils ont induit l'activation forcée d'un gène (nommé Pax4) dans toutes les cellules alpha. Les résultats ont montré que ces cellules alpha, continuellement régénérées, sont converties en cellules bêta conduisant ainsi à une augmentation massive du nombre de ces dernières. Ces cellules sont fonctionnelles et permettraient de traiter un diabète induit. Cependant, ces résultats bien que prometteurs ont été obtenus chez la souris et doivent maintenant être validés chez l'homme (101).

Bien que, ces vingt dernières années, les recherches concernant les cellules souches aient beaucoup progressé, des points restent à éclaircir pour pouvoir envisager des essais sur l'homme en vue d'obtenir des traitements sûrs et efficaces.

Conclusion :

L'évolution de la recherche médicale sur le diabète permet maintenant de proposer un arsenal thérapeutique de plus en plus large afin de pouvoir combiner différents analogues de l'insuline, de manière à reproduire le cycle sécrétoire physiologique. L'objectif tend à évoluer vers une administration de l'insuline par une voie autre que la voie sous-cutanée, et aux injections, par développement de molécules à tropisme pulmonaire ou intestinal. Quant au remplacement définitif de l'insulinothérapie par de nouvelles techniques de greffes cellulaires, que ce soit d'îlots pancréatiques ou de cellules souches, des progrès ont été faits, qui permettront peut-être une alternative aux injections d'insuline dans quelques années.

CONCLUSION

Le diabète est une pathologie qui se définit par une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L (7 mmol/L), mesurée à deux reprises. Cette maladie est en forte augmentation en France mais également dans le monde. Au cours du siècle dernier, de nombreux progrès ont été fait concernant l'insulinothérapie, ce qui a amené à une réduction significative de la mortalité et de la morbidité liées au diabète, tout en améliorant la qualité de vie de millions de patients. En amont de ces grandes avancées, les préparations les plus employées étaient à base d'insuline bovine ou porcine. Le développement de techniques de génie génétique a par la suite permis de produire une insuline exogène recombinante, identique à la molécule physiologique produite par le pancréas et, dans des quantités industrielles.

L'insuline, de par sa nature protéique, est une molécule fragile facilement dégradable. Produire de manière industrielle une insuline médicament, avec un haut niveau de qualité, est là aussi un enjeu, pour lequel il est nécessaire de parfaitement maîtriser le procédé de fabrication, à cause notamment des nombreux facteurs de dégradation possibles. Que ces derniers soient chimiques, comme les interactions possibles avec les excipients entrant dans la fabrication même du produit, ou physiques comme la lumière ou la température, ce sont des éléments à ne pas négliger. Il est donc important de les identifier pour pouvoir les contrôler, d'autant plus que les conséquences ne sont pas toujours visibles sur le produit lui-même, mais se répercuteront le plus souvent sur le patient par une inefficacité du traitement.

La mise sur le marché de nouveaux types d'analogues (insuline rapide ou basale par exemple), a permis au fil des ans de diversifier l'arsenal thérapeutique des diabétologues, dans le but d'obtenir un meilleur contrôle glycémique chez les patients diabétiques. Pour cela, il est important de reproduire le plus fidèlement possible le cycle sécrétoire physiologique de l'insuline, au sein de l'organisme. La voie sous cutanée est la principale voie d'administration de l'insulinothérapie. Elle se heurte néanmoins à une certaine variabilité dans l'absorption, mais aussi et surtout, à une barrière psychologique chez le patient face à l'idée d'injections quotidiennes et multiples.

Pour ces raisons, les avancées sur les analogues de l'insuline ont été complétées par le développement de dispositifs utilisant de nouvelles voies d'administration, comme la voie pulmonaire ou encore la voie orale. D'autres alternatives thérapeutiques, permettent-elles de pallier aux injections quotidiennes en s'orientant plutôt vers la restauration de la sécrétion pancréatique d'insuline, via la greffe d'un pancréas artificiel, d'îlots de Langerhans, ou encore de cellules souches.

Ainsi, même si ces dispositifs demandent encore à être perfectionnés, ils devraient offrir aux patients une alternative à l'administration d'insuline par voie sous-cutanée, dans les années à venir.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Papyrus Ebers.....	8
Figure 2 : Portrait de Claude Bernard	9
Figure 3 : Portrait de Paul Langerhans	10
Figure 4 : Portrait de Frederick Grant Banting	19
Figure 5 : Portrait de Charles Best	19
Figure 6 : Portrait de John James Rickard Macleod	19
Figure 7 : Portrait de Léonard Thompson sauvé par ces injections d'extraits pancréatiques	21
Figure 8 : Charles Best et Frédéric Banting avec un chien utilisé dans leurs expériences pour isoler l'insuline le 11 janvier 1922	21
Figure 9 : Cristaux d'insuline	23
Figure 10 : Portrait de Frederick Sanger.....	23
Figure 11 : Portrait de Rosalyn Yalow et Solomon Berson	24
Figure 12 : Schéma présentant les zones d'administration recommandées.....	26
Figure 13 : Représentation d'un cathéter droit.....	27
Figure 14 : Représentation d'un cathéter tangentiel.....	27
Figure 15 : Exemple de pompe à insuline.....	27
Figure 16 : Pompe à insuline implantée.....	28
Figure 17 : Exemple de stylo-injecteur au design discret (modèle HumaPen Luxura HD de Lilly).....	29
Figure 18 : Schéma des différentes pièces constituant un stylo injecteur	29
Figure 19 : Exemple de seringue à insuline	31
Figure 20 : Représentation schématique des différents types de cellules au sein des îlots de Langerhans	32
Figure 21 : Schéma de la synthèse la synthèse de l'insuline	33
Figure 22 : Représentation schématique d'une molécule d'insuline	33
Figure 23 : Schéma représentant le rôle du récepteur à l'insuline.....	34
Figure 24 : Schéma présentant l'effet de la liaison de l'insuline sur son récepteur.....	34
Figure 25 : Schéma présentant les différences entre les îlots de Langerhans d'un pancréas sain par rapport à celui d'un patient souffrant de diabète de type 1	37
Figure 26 : Réaction de désamination de l'asparagine	41
Figure 27 : (A) Mécanismes moléculaires de formation de la dityrosine	56
Figure 28 : Schéma d'une insuline lispro	62
Figure 29 : Schéma d'une insuline aspart.....	62
Figure 30 : Schéma d'une insuline glulisine.....	63
Figure 31 : Schéma d'une insuline glargine	64
Figure 32 : Schéma d'une insuline detemir.....	65
Figure 33 : Schéma représentant un pancréas bioartificiel	74
Figure 34 : Schéma présentant le déroulement d'une greffe suite à un don de pancréas.	75

BIBLIOGRAPHIE

1. **Vexiau, P.** *Les dates clés qui ont mené à la découverte de l'insuline*. [Fédération française des diabétiques] consulté en juin 2015. disponible sur http://www.afd.asso.fr/sites/default/files/Fiche_90_ans_insuline.pdf.
2. *Portraits de Médecins*. [Medarus] 15 février 2015. disponible sur <http://medarus.org/Medecins/MedecinsTextes/macleod.htm>.
3. *La Hijama à travers les âges*. [Cupping Hijama Troyes] consulté en juin 2015. disponible sur <http://hijama-troyes.fr/un-peu-dhistoire/>.
4. *Claude Bernard*. [Wikipédia] 24 mai 2015. disponible sur http://fr.wikipedia.org/wiki/Claude_Bernard.
5. *Paul Langerhans*. [Wikipédia] 11 février 2015. disponible sur http://fr.wikipedia.org/wiki/Paul_Langerhans.
6. *Le diabète*. [ANSM] 2015. <http://ansm.sante.fr/Dossiers/Diabete/Le-diabete/%28offset%29/0>.
7. **Pr. Boitard, C.** *Diabète de type 1 (DID)*. [Inserm] avril 2014. disponible sur <http://www.inserm.fr/thematiques/physiopathologie-metabolisme-nutrition/dossiers-d-information/diabete-de-type-1-did>.
8. *Acidocétose diabétique : physiopathologie, étiologie, diagnostic, traitement*. [Faculté de médecine Pierre et Marie Curie] consulté en juin 2015. disponible sur <http://www.chups.jussieu.fr/polys/diabeto/POLY.Chp.8.html>.
9. **Pr. Altman, J.J.** *Diabète HEGP*. [Assistance Publique Hôpitaux de Paris] juin 2015. disponible sur <http://www.hegp.fr/diabeto/index.html>.
10. **Dr. Camus, C.** *Stratégie de prise en charge des patients diabétiques de type 2, en fonction des valeurs d'HbA1c, selon les recommandations : enquête réalisée auprès de médecins généralistes du Nord Pas De Calais, maîtres de stage des universités*. [Thèse - Faculté de médecine de Lille] 30 septembre 2013. disponible sur <http://pepite-depot.univ-lille2.fr/nuxeo/site/esupversions/de9123f1-1f08-42c6-a95c-16fea116a25f>.
11. *Le diabète*. [Institut Pasteur de Lille] consulté en juillet 2015. disponible sur <http://www.pasteur-lille.fr/fr/etudier-et-comprendre/nos-avancees/diabete/>.
12. *Traitement du diabète de type 2*. [Faculté de médecine de Toulouse] consulté en juillet 2015. disponible sur http://www.medecine.ups-tlse.fr/dcem3/module14/diabetologie/Chap05_TRAITEMENT_DIABETE_TYPE%202.pdf.
13. *Diabètes de type 2 : quand et quels médicaments prescrire pour le contrôle glycémique*. [HAS] 13 février 2013. disponible sur http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1359987/fr/diabete-de-type-2-quand-et-quels-medicaments-prescrire-pour-le-controle-glycemique.
14. **Pr. Altman, J.J.** *Les incréтино-mimétiques*. [Assistance Publique Hôpitaux de Paris] juin 2015. disponible sur <http://www.hegp.fr/diabeto/traitementincretinomimetiques.html>.
15. *Traitement du diabète de type 2*. [Faculté de médecine Pierre et Marie Curie] consulté en juillet 2015. disponible sur <http://www.chups.jussieu.fr/polys/diabeto/POLY.Chp.14.4.html>.
16. *Stratégie médicamenteuse du contrôle glycémique du diabète de type 2*. [HAS] janvier 2013. disponible sur http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-02/10irp04_reco_diabete_type_2.pdf.
17. *Frederick G. Banting*. [NNDb] 2014. disponible sur <http://www.nndb.com/people/843/000126465/>.
18. *Charles Herbert Best*. [Wikipédia] 13 juillet 2015. disponible sur https://fr.wikipedia.org/wiki/Charles_Herbert_Best.

19. *John James Rickard Macleod*. [Wikipédia] 18 juillet 2015. disponible sur https://fr.wikipedia.org/wiki/John_James_Rickard_Macleod.
20. **Marsh, J.** *La découverte de l'insuline*. [Historica Canada] consulté en juin 2015. disponible sur <http://www.encyclopediecanadienne.ca/fr/article/la-decouverte-de-linsuline/>.
21. **Bohuon, C.** *Fabuleux hasards : histoire de la découverte de médicaments*. consulté en juin 2015. disponible sur <https://books.google.fr/books?id=2EYvsjCf2X0C&pg=PA59&lpg=PA59&dq=Les+reins+et+la+vessie+ne+cessent+d%E2%80%99%99%>.
22. *Frederick Sanger*. [Wikipédia] 18 juillet 2015. disponible sur https://fr.wikipedia.org/wiki/Frederick_Sanger.
23. *Honoring VA pioneers: Diabetes research led to 1977 Nobel Prize*. [U.S. Department of Veterans Affairs] 31 mars 2015. disponible sur <http://www.google.fr/imgres?imgurl=http://www.blogs.va.gov/VAntage/wp-content/uploads/2015/03/>.
24. *Insulinothérapie par pompe*. [VitalAir] consulté en juillet 2015. disponible sur <http://www.vitalaire.fr/fr/les-services-vitalaire/les-traitements/perfusion-1.html>.
25. *Qu'est-ce-que la pompe à insuline ?* [Diabète Québec] août 2014. disponible sur <http://www.diabete.qc.ca/fr/vivre-avec-le-diabete/soins-et-traitements/medicaments-et-insuline/la-pompe-a-insuline>.
26. *La pompe à insuline*. [Association « Il nous pompe ce diabète »] 9 avril 2006. disponible sur http://fam.gillard.free.fr/main_pompe.php.
27. *La gestion des hypoglycémies*. [Medtronic] 2014. disponible sur <https://www.medtronic-diabete.com/gerer-hypoglycemie/pompe-insuline-solution>.
28. *Avantage de la pompe*. [Isis Diabète] consulté en juillet 2015. disponible sur <http://www.isismedical.fr/diabete-presentation.php>.
29. *Les systèmes d'administration d'insuline*. [ANSM] consulté en juillet 2015. disponible sur <http://ansm.sante.fr/Dossiers/Diabete/Les-systemes-d-administration-d-insuline/%28offset%29/3>.
30. *HumaPen Luxura HD*. [The 120 site] consulté en juillet 2015. disponible sur http://the120site.com/html/products/para_HUMAPEN%C2%AE_LUXURA%C2%A0HD.htm.
31. *Les stylos injecteurs*. [BD] consulté en juillet 2015. disponible sur <https://www.bd.com/ca/diabetes/french/page.aspx?cat=16751&id=17004>.
32. *Seringue à insuline*. [BD] consulté en juillet 2015. disponible sur <https://www.bd.com/ca/diabetes/french/page.aspx?cat=16751&id=17001>.
33. *Seringues BD Micro-fines*. [BD] consulté en juillet 2015. disponible sur <http://www.bd.com/fr/diabetes/page.aspx?cat=6980&id=14004>.
34. *Seringue à insuline*. [Parapharm Matériel Médical] consulté en juillet 2015. disponible sur <http://www.parapharm.fr/catalogues/medico/lusage-unique/les-seringues/2527-seringue-a-insuline.html>.
35. **Denef, J.F.** *Les glandes endocrines*. [UCL Faculté de médecine] 1996. disponible sur <http://www.isto.ucl.ac.be/safe/endo3.htm>.
36. —. *Les glandes endocrines du système digestif*. [UCL Faculté de médecine] 1996. disponible sur <http://www.google.fr/imgres?imgurl=http://www.isto.ucl.ac.be/safe/images/00012660.jpg&imgrefurl=http://www.isto.ucl.ac.be/sa>.
37. **Raynal, R.** *L'insuline*. [Exobiologie] 14 avril 2002. disponible sur <http://www.exobiologie.info/Pages/insuline.html>.

38. *Insulin synthesis, secretion and degradation*. [Diapedia] 13 août 2014. disponible sur <http://www.diapedia.org/metabolism/insulin-synthesis-secretion-and-degradation>.
39. *Molécule d'insuline humaine*. [Docteurclik, Dictionnaire médical] consulté en août 2015. disponible sur [http://www.google.fr/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fwww.docteurclik.com%2Fgalerie-photos%2Fimage_3097.jpg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fwww.docteurclik.com%2Fgalerie-photos%2Fimage_3097.jpg](http://www.google.fr/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fwww.docteurclik.com%2Fgalerie-photos%2Fimage_3097.jpg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fwww.docteurclik.com%2Fgalerie-photos%2Fimage_3097.jpg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fwww.docteurclik.com%2Fgalerie-photos%2Fimage_3097.jpg).
40. *Le pancréas endocrine*. [Faculté de médecine de Toulouse] consulté en juillet 2015. disponible sur <http://www.medecine.ups-tlse.fr/dcem1/histologie/pancreas%20endocrine%20D1.pdf>.
41. **Porcher, C.** *Physiologie des régulations BI 632 L3*. [Institut de neurobiologie de la Méditerranée] consulté en juillet 2015. disponible sur http://biologie.univ-mrs.fr/upload/p239/Physio_L3_glycemie_2013.pdf.
42. **Jaspard, E.** *Rôle de GLUT4, de l'insuline et du glucagon dans la régulation de la glycolyse*. [Faculté de médecine d'Angers] 2013. disponible sur <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/TexteTD/6ModuleS5BG2/ZsuiteTDS5BG2/3RoleInsulinGlucagon/1RoleInsulinGlucagon.htm>.
43. **Capeau, J.** *Voies de signalisation de l'insuline : mécanismes affectés dans l'insulino-résistance*. [Médecine/Sciences] 2003. disponible sur <http://www.erudit.org/revue/ms/2003/v19/n8/007113ar.html>.
44. *Islets of Langerhans*. [Dreamstime] consulté en juillet 2015. disponible sur <http://fr.dreamstime.com/image-stock-%C3%AElots-de-langerhans-image39700721>.
45. **Delahaye, A.** *Régulation du pH sanguin*. consulté en juillet 2015. disponible sur http://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/med_physio-regulation-du-ph-sanguin.pdf.
46. *pH*. [Encyclopédie Larousse] consulté en juillet 2015. disponible sur <http://www.larousse.fr/encyclopedie/divers/pH/78945>.
47. **Brange, J. et al.** *Chemical stability of insulin. 1. Hydrolytic degradation during storage of pharmaceutical preparations*. [PubMed] 9 juin 1992. Chemical stability of insulin. 1. Hydrolytic degradation during storage of pharmaceutical preparations. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1409351>.
48. *The isoaspartome*. [Boston University School of Medicine] 5 janvier 2012. disponible sur <http://www.bumc.bu.edu/ftms/research/isoaspartome/>.
49. **Najjar, A.** *A rapid, isocratic HPLC method for determination of insulin and its degradation product*. 2014. disponible sur <http://www.hindawi.com/journals/ap/2014/749823/>.
50. **Gauthier, D.** *Tampon, pH et pHmétrie*. 5 juin 2006. disponible sur http://www8.umoncton.ca/umcm-gauthier_didier/siitub/pHmetrie.html.
51. **Brange, J. et al.** *Chemical stability of insulin. 3. Influence of excipients, formulation, and pH*. [PubMed] 1992. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1418641>.
52. **Derewenda, U. et al.** *Phenol stabilizes more helix in a new symmetrical zinc insulin hexamer*. [PubMed] 13 avril 1989. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/264816>.
53. **Scotchler, JW. et al.** *Deamidation of glutaminy residues: dependence on pH, temperature, and ionic strength*. [PubMed] mai 1974. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4407737>.
54. **Brange, J. et al.** *Neutral insulin solutions physically stabilized by addition of Zn²⁺*. [PubMed] disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2951208>.
55. *Structure des protéines*. [Medecine.Info] avril 2010. disponible sur <http://www.cours-medecine.info/biochimie/structure-proteines.html>.
56. *Dénaturation des protéines*. [Université de Lille] consulté en août 2015. disponible sur http://biochim-agro.univ-lille1.fr/proteines/co/ch1_II_a.html.

57. **Vimalavathini, R. et al.** *Effect of temperature on the potency & pharmacological action of insulin.* [Pubmed] août 2009. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19797814>.
58. *Freezing insuline ; Injection changes.* [American Diabetes Association] 2015. disponible sur <http://www.diabetesforecast.org/2008/aug/freezing-insulin-injection-changes.html>.
59. **Pattison, D. et al.** *Photo-oxidation of proteins.* [Pubmed] 2012. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21858349>.
60. **Kerwin, BA. Et al.** *Protect from light: photodegradation and protein biologics.* [Pubmed] juin 2007. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17230445>.
61. **Correia, M. et al.** *UV-light exposure of insulin: pharmaceutical implications upon covalent insulin dityrosine dimerization and disulphide bond photolysis.* [Pubmed] 2011. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23227203>.
62. **Mozziconacci, O. et al.** *Photolysis of recombinant human insulin in the solid state: formation of a dithiohemiacetal product at the C-terminal disulfide bond.* [Pubmed] janvier 2012. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21748537>.
63. *Glass container for pharmaceutical use, monograph 30201.* [Council of Europe] 2002. disponible sur <http://www.edqm.eu/fr>.
64. *Informations techniques sur la fabrication d'appareillages en verre borosilicatés.* [DeDietrich Process System] 2002. disponible sur http://www.dedietrich-semur.com/publicmedia/original/244/99/en/01_InfoTechn_f.pdf.
65. **Dufour, M. Bergeron et J.C.** *Insulinothérapie : Nouvelles molécules et voies d'administration.* [Erudit] 11 novembre 2004. disponible sur <https://www.erudit.org/revue/ms/2004/v20/n11/009699ar.html>.
66. **Heinemann, L. et al.** *Variability of insulin absorption and insulin action.* [Pubmed] 2002. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12450450>.
67. **Brange, J. et al.** *Monomeric insulins obtained by protein engineering and their medical implications.* [Pubmed] 16 juin 1988. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3287182>.
68. **Howey, D.C. et al.** *[Lys(B28), Pro(B29)]-human insulin. A rapidly absorbed analog of human insulin.* [Pubmed] mars 1994. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8314011>.
69. *Insulin lispro protamine, human.* [Drugs.com] 13 juillet 2015. disponible sur <http://www.drugs.com/drug/insulin-lispro-protamine-human.html>.
70. **Heinemann, L. et al.** *Time-action profile of the insulin analogue B28Asp.* [Pubmed] juillet 1996. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8840108>.
71. *Insulin aspart.* [Wikipédia] 4 juillet 2015. disponible sur https://en.wikipedia.org/wiki/Insulin_aspart.
72. *Apidra®.* [Monographie de produit Sanofi] 11 février 2014. disponible sur <http://products.sanofi.ca/fr/apidra.pdf>.
73. *Insulin glulisine [rDNA origin] injection.* [Apidra] avril 2014. disponible sur http://www.insulin-pumpers.org/faq/apidra_TXT.html.
74. *BioChaperone®.* [Adocia] consulté en septembre 2015. disponible sur <http://www.adocia.fr/WP/technologie/technologie-biochaperone/?lang=fr>.
75. **Konrad, D. et al.** *Lantus® et Levemir® - deux nouveaux analogues d'insulines à effet prolongé.* [Swiss paediatrics] 4 novembre 2004. disponible sur <http://swiss-paediatrics.org/sites/default/files/paediatrica/vol15/n4/pdf/50-51.pdf>.
76. **Bolli, G.B. et al.** *Insulin glargine.* [Pubmed] 5 août 2000. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10981882>.

77. *Journal of drug delivery*. [Hindawi] consulté en août 2015. disponible sur <http://www.hindawi.com/journals/jdd/2011/195146/fig1/>.
78. **Heinemann, L. et al.** *Time-action profile of the soluble, fatty acid acylated, long-acting insulin analogue NN304*. [Pubmed] 16 avril 1999. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10220208>.
79. *Levemir*. [RxList] 12 février 2013. disponible sur <http://www.rxlist.com/levemir-drug.htm>.
80. **Reix, N. et al.** *L'insuline par voie orale : promesses et réalités*. [Science Direct] novembre 2012. disponible sur <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1957255712704455>.
81. **Fasano, A. et al.** *Modulation of intestinal tight junctions by zonula occludens toxin permits enteral administration of insulin and other macromolecules in an animal model*. [Pubmed] 15 mars 1997. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC507928/>.
82. **Xia, CQ. et al.** *Hypoglycemic effect of insulin-transferrin conjugate in streptozotocin-induced diabetic rats*. [Pubmed] novembre 2000. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11046093>.
83. **Wawrezinieck, A. et al.** *Biodisponibilité et vecteurs particuliers pour la voie orale*. [Inserm] juin 2008. disponible sur http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/6484/MS_2008_6-7_659.html?sequence=16.
84. **Sarmiento, B. et al.** *Alginate/Chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery*. [Research gate] décembre 2007. disponible sur http://www.researchgate.net/publication/6258833_AlginateChitosan_Nanoparticles_are_Effective_for_Oral_Insulin_Delivery.
85. **Becquemin, M.-H. et al.** *L'insuline par voie inhalée : un modèle pour l'absorption systémique pulmonaire ?* [Elsevier Masson] 2008. disponible sur <http://www.em-consulte.com/article/161273/linsuline-par-voie-inhalee-un-modele-pour-labsorp>.
86. **Himmelmann, A. et al.** *The impact of smocking on inhaled insulin*. [Pubmed] mars 2003. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12610021>.
87. **Henry, R. et al.** *Inhaled insulin using the AERx Insulin Diabetes Management System in healthy and asthmatic subjects*. [Pubmed] mars 2003. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12610035>.
88. **Patton, J.S. et al.** *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled insulin*. [Pubmed] 2004. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15355125>.
89. **Odegard, P.S. et al.** *Inhaled insulin: Exubera*. [Pubmed] mai 2005. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15827072>.
90. **Kumareswaran, K. et al.** *Artificial pancreas : an emerging approach to treat Type 1 diabetes*. [Pubmed] 2009. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19572795>.
91. **Tamborlane, W.V. et al.** *JDRF randomized clinical trial to assess the efficacy of real-time continuous glucose monitoring in the management of type 1 diabetes: research design and methods*. [Pubmed] 2008. disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18828243>.
92. **Bourlès, H.** *Régulateur PID*. [Wikipédia] 7 avril 2015. disponible sur https://fr.wikipedia.org/wiki/R%C3%A9gulateur_PID.
93. **Hovorka, R.** *Nonlinear model predictive control of glucose concentration in subjects with type 1 diabetes*. [Institute of Physics Publishing] 2004. disponible sur http://www.stat.yale.edu/~jtc5/diabetes/NonlinearModelPredictiveControl_Hovorka_04.pdf.
94. *What is pancreas? What is an artificial pancreas device system ?* [FDA] 30 mars 2015. disponible sur

<http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/HomeHealthandConsumer/ConsumerProducts/ArtificialPancreas/ucm259548.htm>.

95. *Diabète de type 1 : le succès durable de la greffe de cellules pancréatiques est confirmé*. [Inserm] 3 septembre 2009. disponible sur

http://www.inserm.fr/content/download/3956/33877/file/dp_pattou_diabete1_03sept09.pdf.

96. *La transplantation d'îlots pancréatiques libres*. [CEED] consulté en août 2015. disponible sur <http://www.ceed-diabete.org/la-recherche/transplantation-d-ilots-libres>.

97. **Pr. Renard, E.** *Thérapie cellulaire du diabète : greffes de pancréas et d'îlots de Langerhans. Etat actuel et perspectives*. [CHU Montpellier] consulté en août 2015. disponible sur http://irb.chu-montpellier.fr/fr/PDF/DU2006_2eme_semaine/2006_04_03_E_Renard_TTT_par_TC_du%20Diabete.pdf.

98. **Kunjom Mfopou, J.** *Différenciation des cellules souches pluripotentes en cellules pancréatiques*. [Médecine/Sciences] 2013.

<http://www.medecinesciences.org/articles/medsci/abs/2013/09/medsci2013298-9p736/medsci2013298-9p736.html>.

99. **Pattison, S.** *Le diabète de type 1 : comment les cellules souches pourraient-elles aider ?* [EuroStemCell] 16 décembre 2011. disponible sur <http://www.eurostemcell.org/fr/factsheet/le-diab%C3%A8te-de-type-1-comment-les-cellules-souches-pourraient-elles-aider>.

100. **Faustman, D.L.** *Nouveaux traitements pour le diabète : la génération de nouvelles cellules productrices d'insuline*. [Diabetes Voice] octobre 2004. disponible sur https://www.idf.org/sites/default/files/attachments/article_298_fr.pdf.

101. **Collombat, P. et Mansouri, A.** *Diabète : quand les cellules alpha deviennent bêta*. [Inserm] 6 août 2009. disponible sur <http://www.inserm.fr/espace-journalistes/diabete-quand-les-cellules-alpha-deviennent-beta>.

102. **Jaspard, E.** *La désamidation*. [Université d'Angers] consulté en août 2015. disponible sur <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/2N2NH3aetUree/1N2NH3AAetUree.htm>.

AUTEUR : M. Romain DELPECH

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse le 26 novembre 2015

DIRECTEUR DE THÈSE : M. Alain NONN

TITRE : Etat des lieux passé et actuel de l'insuline (thérapies et procédés) et perspectives d'évolution.

RÉSUMÉ en français :

Le diabète est une pathologie en forte augmentation en France et dans le monde. La production à grande échelle d'insulines exogènes recombinantes a permis d'améliorer significativement la qualité de vie des patients. De par sa nature protéique, l'insuline est sensible à de nombreux facteurs de dégradation, qu'ils soient physiques ou chimiques, pouvant survenir au cours de son procédé de fabrication. Leur identification et leur maîtrise sont donc essentielles pour assurer un médicament de haute qualité. Dans l'avenir, de nouveaux analogues vont être développés afin d'être encore plus fidèles au cycle sécrétoire physiologique. De plus, des alternatives aux injections quotidiennes sont envisagées en utilisant de nouvelles voies d'administration ou la restauration de la sécrétion pancréatique via la greffe cellulaire.

TITLE: History and current status of insulin (therapies and processes) and perspectives.

SUMMARY in English:

Diabetes is an epidemical disease in France and in the world. The large scale manufacturing of recombinant exogenous insulin has significantly improved the quality of life for patients. Because of its protein structure, insulin is sensitive to many degradation factors, both physical and chemical, that may occur during its manufacturing process. Their identification and control are essential to ensure a high quality product. In the future, new analogues will be developed to better align with the physiological secretory cycle. In addition, alternatives to daily injections are contemplated by using new routes of administration or by restoring pancreatic secretion via cells transplant.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Pharmacie

MOTS-CLÉS : Insuline – Traitement du diabète – Production industrielle – Dégradation physique et chimique – Analogues.

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Paul Sabatier – Toulouse 3
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35, chemin des maraîchers
31062 Toulouse Cedex 09
