



HAL
open science

Les particules dans les médicaments destinés à l'usage parentéral : cas pratique d'une validation de méthode

Wafa El-Hadeuf

► **To cite this version:**

Wafa El-Hadeuf. Les particules dans les médicaments destinés à l'usage parentéral : cas pratique d'une validation de méthode. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01121107

HAL Id: dumas-01121107

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01121107>

Submitted on 27 Feb 2015

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

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

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2014

<p>Les particules dans les médicaments destinés à l'usage parentéral Cas pratique d'une validation de méthode</p>
--

THESE

PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ÉTAT

Wafa EL-HADEUF

Née le 19 Avril 1985 à Constantine

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE *

Le Jeudi 27 Novembre 2014

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Directeur de thèse : **Dr. Markus Lymann**

Responsable du département de Contrôle Qualité et *Qualified Person* au laboratoire B.Braun Medical (Suisse)

Président du jury : **Pr. Denis Wouessidjewe**

Professeur à l'UFR de Pharmacie de Grenoble, et Responsable de la filière de pharmacie industrielle

Membres du jury : **Dr. Isabelle Rieu**

Professeur Associé à l'UFR de Pharmacie de Grenoble et Responsable Qualité au CHU de Grenoble

Dr. Luc Choisnard

Maître de Conférences à l'UFR de Pharmacie de Grenoble et Responsable de l'UE Validation de méthode

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

Doyen de la Faculté :

M. le Pr. Christophe RIBUOT

Vice-doyen et Directrice des Etudes :

Mme Delphine ALDEBERT

Année 2013-2014

Liste des enseignants de l'UFR de PHARMACIE

Mise à jour le 1^{er} Juillet 2014

STATUT	NOM	PRENOM	DPT*	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	D4	LAPM - UMR CNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoit	D5	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
PU	BAKRI	Aziz	D5	THEREX-TIMC-IMAG CNRS UMR 5525
MCU	BATANDIER	Cécile	D1	LBFA - INSERM U1055
MCU-PH	BEDOUCHE	Pierrick	D5	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	D5	HP2 - INSERM U1042
PAST	BELLET	Béatrice	D5	-
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	D3	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	BOURGOIN	Sandrine	D1	IAB - CRI INSERM UJF U823
MCU	BRETON	Jean	D1	L.C.I.B. - UMR E3 CEA UJF
MCU	BRIANCON- MARJOLLET	Anne	D5	HP2 - INSERM U1042
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	D4	IBS - UMR 5075 CEA CNRS UJF
PU	BURMEISTER	Wim	D4	UVHCI - UMI 3265 UJF EMBL CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoit	D1	IAB - CRI INSERM UJF U823
Professeur Émérite	CALOP	Jean	D5	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	D1	LAPM – UMR 5163 CNRS UJF
AHU	CHANOINE	Sébastien	D5	IAB
MCU	CHOISNARD	Luc	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU-PH	CORNET	Murielle	D4	THEREX – TIMC IMAG UMR 5525 CNRS UJF
PU-PH	DANEL	Vincent	D5	SMUR SAMU

* D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements(DMBMT)»

D2 : Département «Bases Physicochimiques du Médicament »

D3 : Département «Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments »

D4 : Département « Bases immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et Médicaments associés »

D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »

D6 : Département « Anglais »

STATUT	NOM	PRENOM	DPT*	LABORATOIRE
PU	DECOUT	Jean-Luc	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	DELETRAZ-DELPORTE	Martine	D5	SIS -EAM 4128 UCB
MCU	DEMEILLIERS	Christine	D1	LBFA - INSERM U1055
PU	DROUET	Christian	D4	AGIM - CNRS 3405
PU	DROUET	Emmanuel	D4	UVHCI - UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	DURMORT - MEUNIER	Claire	D1	I.B.S UMR 5075 CNRS
ATER	FALLECKER	Catherine	D5	HP2- INSERM U1042
PU-PH	FAURE	Patrice	D1	HP2- INSERM U1042
AHU	FILIOL (VAN NOOLEN)	Laetitia	D1	HP2- INSERM U1042
PRCE	FITE	Andrée	D6	-
AHU	GARNAUD	Cécile	D4	THEREX, TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS UJF
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	D3	-
MCU-PH	GERMI	Raphaële	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	GILLY	Catherine	D3	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	D5	HP2- INSERM U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	D6	-
ATER	GRAS	Emmanuelle	D5	-
Professeure Émérite	GRILLOT	Renée	D4	-
MCU	GROSSET	Catherine	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	GUIEU	Valérie	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	GUIEU	Valérie	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	HININGER-FAVIER	Isabelle	D1	LBFA - Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	D5	HP2- INSERM U1042
MCU	KHALEF	Nawel	D5	THEREX -TIMC-IMAG CNRS UMR 5525
MCU	KRIVOBOK	Serge	D3	iRTSV UMR 5249 CEACNRSUJF
ATER	LEHMANN	Sylvia	D1	-
PU	LENORMAND	Jean Luc	D1	THEREX, TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF CNRS
PU	MARTIN	Donald	D1	SyNaBi-TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF CNRS
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	D4	L.E.C.A
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	D4	THEREX - TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCU	MOUHAMADOU	Bello	D3	L.E.C.A

* D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements(DMBMT)»

D2 : Département «Bases Physicochimiques du Médicament »

D3 : Département «Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments »

D4 : Département « Bases immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et Médicaments associés »

D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »

D6 : Département « Anglais »

STATUT	NOM	PRENOM	DPT*	LABORATOIRE
MCU	NICOLLE	Edwige	D3	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	OUKACINE	Farid	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	PERES	Basile	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PEUCHMAUR	Marine	D3	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	PEYRIN	Éric	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	RACHIDI	Walid	D1	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF
MCU	RAVELET	Corinne	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	RIBUOT	Christophe	D5	HP2- INSERM U1042
PAST	RIEU	Isabelle	D5	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	Anne -Marie	D1	-
PU-PH	SEVE	Michel	D1	IAB-CR INSERM / UJF U823
MCU	SOUARD	Florence	D3	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	TARBOURIECH	Nicolas	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
PAST	TROUILLER	Patrice	D5	-
MCU	VANHAVERBEKE	Cécile	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	WOUESSIDJEWE	Denis	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS

* D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements(DMBMT)»

D2 : Département «Bases Physicochimiques du Médicament »

D3 : Département «Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments »

D4 : Département « Bases immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et Médicaments associés »

D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »

D6 : Département « Anglais »

AGIM : Age – Imagerie – Modélisation

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

IAB : Institut Albert Bonniot

IBS : Institut de Biologie Structurale

CEA : Centre Energie Atomique

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIB : Centre d'Innovation en Biologie

CRI : Centre de Recherche INSERM

CNRS : Centre National de Recherche Scientifique

DCE : Doctorants Contractuels Enseignement

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

EAM : équipe d'accueil mixte

EMBL : European Molecular Biology Laboratory

HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

IAB : Institut Albert Bonniot,

IBS : Institut de Biologie Structurale

IRTSV : Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant

JR : Jean Roget

LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes

LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux

LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine

LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques

MCU : Maître de Conférences des Universités

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

PAST : Professeur Associé à Temps Partiel

PRAG : Professeur Agrégé

PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement

PU : Professeur des Universités

PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers

SIS : Santé-Individu-Société

SMUR : Service mobile d'urgence et de réanimation

SyNaBi : Systèmes Nanobiotechnologiques, Biomimétiques et Biotechnologies

THEMAS : Epidémiologie et méthodologie de la recherche clinique

THEREX : Thérapeutique Recombinante Expérimentale

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

UMR: Unité Mixte de Recherche

UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse d'exercice en pharmacie.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon encadrant direct, le **Docteur Markus Lymann**, Responsable du département de Contrôle Qualité et *Qualified Person* au laboratoire B.Braun, qui m'a accueilli au sein de son équipe, et mis à disposition les équipements, la documentation et les ressources nécessaires à la réalisation de ce projet, qui a débuté durant mon stage de fin d'étude et s'est poursuivi au-delà.

Merci pour les idées et les conseils qu'il m'a donnés, pour les corrections qu'il apportées à mon travail, et de manière générale pour son encadrement bienveillant, le temps et l'attention qu'il m'a accordés ainsi que sa contribution à la construction de mon parcours professionnel.

J'aimerais exprimer ma sincère gratitude au **Professeur Denis Wouessidjewe**, Professeur d'Université qui a présidé le jury de ma thèse, et grâce à qui j'ai pu trouver ma voie en accédant à la filière industrielle. Je le remercie pour son suivi et son encadrement qui m'ont permis de m'intégrer dans ma nouvelle promotion en 5^e année de pharmacie, et d'appréhender les différents secteurs pharmaceutiques, grâce aux séminaires et au « projet médicament » qui furent riches d'enseignements.

Un grand merci au **Docteur Isabelle Rieu**, Professeur Associé et Responsable Qualité – Circuits du Médicament au CHU Grenoble, pour sa contribution à ma formation dans les domaines de la qualité pharmaceutique, et pour avoir accepté d'évaluer mon travail en faisant partie du jury.

Un grand merci au **Docteur Luc Choissard**, Maître de Conférence d'Université, avec qui j'ai beaucoup appris durant les projets sur lesquels j'ai pu collaborer durant mes études, et qui a accepté en plus de son travail, de relire cette thèse et de l'évaluer.

Ce travail a impliqué plusieurs personnes du laboratoire B.Braun que j'aimerais remercier ici.

D'abord, le **Docteur Hélène Favre**, Responsable Validation et Qualification, pour avoir partagé ses connaissances de la validation de méthodes, et apporté son expertise dans le design et la mise en place des tests de validation. Merci également pour ses conseils en *Bonnes Pratiques Documentaires*.

Merci à **Vincent Wisard**, Responsable du Laboratoire des Matières Premières, pour sa collaboration aux investigations de méthode et du procédé de production.

Une pensée particulière pour **Souad Perjo**, technicienne, qui a exécuté les protocoles d'optimisation de méthode sous le flux laminaire, de façon très efficace et soigneuse.

Merci aux techniciennes qui ont participé à la validation, **Catherine Girard** pour avoir participé également au comptage d'une grande série d'échantillons avec patience et soin, et **Corinne Stuebi**, pour avoir également mis à profit ses techniques durant les phases préliminaires du projet.

Merci à **Mickaël Sagné**, technicien de microbiologie, pour sa flexibilité.

Merci également à **Jean-Pierre Jermini**, QA - *Senior Compliance Officer*, pour m'avoir fait bénéficier de son expertise en tant qu'auditeur, et avoir relu et approuvé les rapports et notes de test rédigés dans le cadre de ce projet au laboratoire B.Braun.

Je remercie bien évidemment tous mes autres collègues directs du département de Contrôle Qualité avec qui j'ai pris énormément de plaisir à travailler, **Catherine Hinni**, **Daniel Bocion**, **Didier Wahl**, **Ingrid Balon**, **Julie Thibaudeau**, **Nathalie Desponds**, **Nathalie Sabatier**. Merci pour l'intérêt que vous avez témoigné à mon travail, pour l'esprit d'équipe et l'ambiance agréable au quotidien.

Merci au **Docteur Lucie Bouchoud**, Pharmacien Responsable de Production (HUG), à **Madame Sonia Veluzat**, Responsable des ventes (B.Braun) et au **Docteur Christian Audergon**, Directeur du Management Qualité en Suisse (B.Braun), grâce à qui j'ai eu la chance de rencontrer mon directeur de thèse et d'avoir une expérience très enrichissante en intégrant une équipe expérimentée.

Pour finir, merci à toute personne ayant participé de près ou de loin à ce projet qui a marqué la fin de mes études et qui m'aura tant apporté sur le plan professionnel et humain.

Wafa El-Hadeuf

Dédicace

Parce qu'un travail de diplôme a des répercussions en dehors de la vie professionnelle, et que le vécu influence les futurs professionnels que nous serons, j'aimerais remercier ici les personnes qui m'ont soutenue, et auprès de qui j'ai pu apprendre qu'un pharmacien ne peut proclamer une succession de connaissances scientifiques et de compétences techniques sans des qualités humaines, des valeurs morales et une éthique professionnelle.

D'abord, je dédie ce travail à ma chère maman et mon cher papa qui, en plus de l'éducation et de l'amour qu'ils m'ont donnés, m'ont toujours poussé à donner sans cesse le meilleur de moi-même.

A mes trois sœurs, Sabrina, Mounya et Hayet qui sont souvent une source d'inspiration et un exemple d'excellence à suivre. A mes adorables neveux, Mounou et Zaza.

A mes grands-parents, qui ont toujours cru en moi et m'ont entourée de leur affection.

A toute ma famille. Petits et grands. Et particulièrement à Houda, qui a souvent été présente. Je te souhaite de surfer sur la « nouvelle vague ». La fameuse.

A mon professeur de pharmacie galénique, le Docteur Mohamed-Salah Kaoua, Responsable du Département de Pharmacie Galénique au CHU de Constantine, qui a su me transmettre sa passion et m'a encouragé à poursuivre mes études en pharmacie industrielle.

A ma bande de compagnons dans ce voyage que sont les études de pharmacie.

Inès, Karima, et Moufida. Merci pour ces longues gardes de nuit des laboratoires de microbiologie et biochimie au CHU de Constantine. Elles sont simplement inoubliables !

Premières confrontations avec la réalité, les urgences ... mêmes si les « externes de pharma » sont surtout là pour le coup de fil du ionogramme vital de 3h00, mais on y a réellement appris le rôle et la responsabilité du pharmacien. Dans la douleur, mais avec des fous-rires !

A Urey, mon fidèle binôme de travaux pratiques durant plusieurs années.

A Nadir, l'artiste introuvable à la barbe rousse. Pour les grands débats. До скорой встречи !

A Johanna, Nancy et Pauline, pour votre amitié.

A tous mes camarades de promotion des universités Mentouri et Joseph Fourier. Merci pour les moments sérieux et les moins sérieux que nous avons partagés ensemble.

A mes colocataires grenoblois, Aïkerim, Armelle, Kévin et Marine ! Merci pour l'ambiance amicale et votre joie de vivre. Votre bonne compagnie a marqué mon passage à Grenoble.

A Mina, pour la douce personne que tu es, et la tendre amitié que tu m'offres. RDV à l'Est d'Eden.

A Ramy. Merci pour ta philosophie de vie, ta générosité et les discussions... interminables. Merci pour avoir battu le record de la question qui fâche « et ta thèse ? ».

A nos maîtres de Karaté-Do, du Budo-Karaté-Club de Constantine (BKC), Salim, Didine et Salah, qui nous ont inculqués, en plus de la technique et la discipline, la résistance et l'esprit d'équipe.

Et enfin, à mon cher Chafik. Le seul, l'unique, moteur de tous les projets que j'entreprends, et soutien inestimable durant ces trois années d'études à Grenoble. Merci d'avoir égayé par ta présence ces longs mois de rédaction.

A vous tous,

W.

Avant-propos

L'administration de médicaments par voie parentérale est une pratique incontournable dans la prise en charge des patients et présente de multiples bénéfices, mais ces médicaments peuvent contenir des particules. Chez les patients, les particules injectées avec le médicament atteignent la circulation générale et peuvent avoir un impact médical grave, ce qui en fait une préoccupation d'actualité pour les praticiens de santé, les agences réglementaires ainsi que les industries du médicament.

A l'une des dernières conférences consacrée à ce sujet, qui s'est tenue à Vienne en Mai 2013, le Dr Langille, membre de la FDA, a rappelé quelques événements indésirables graves qui ont marqué la communauté internationale ces dernières années : entre 1984 et 2009, 2 adultes aux USA¹, et 6 nouveaux nés en Europe² sont décédés d'embolie pulmonaire suite à la perfusion de mélanges médicamenteux incompatibles ayant induit la formation de particules, qui se sont révélés être des précipités de sels de Calcium.

On a rapporté également le cas d'un décès en néonatalogie, dû à un infarctus de l'intestin survenu à cause d'éclats de polypropylène³, et d'autres cas de granulomes pulmonaires, où l'autopsie a révélé la présence de fragments de verre et des fibres de coton.⁴

Par ailleurs, quelques études menées sur des animaux ont permis d'établir un lien évident entre la présence de particules et le stress oxydatif pulmonaire⁵, des réponses inflammatoires systémiques ainsi que des pathologies hépatiques.⁶

En résumé, selon Driscoll, les principaux risques associés à une contamination particulaire élevée peuvent être d'ordre embolique, métabolique, immunologique ou pharmacologique. C'est pourquoi il est important pour les industries du médicament de maîtriser ce paramètre au moment de la libération des lots et tout au long de la durée de vie, jusqu'à la date d'expiration du médicament.

La constatation de non-conformités dans les produits destinés la voie parentérale les mène souvent à la quarantaine, et même au retrait du marché, comme nous avons pu le voir ces derniers mois chez quelques *big pharma*, que ceci soit une mesure préventive volontaire, ou corrective imposée par les autorités de santé suite à des réclamations.

Au mois de Juin 2014 par exemple, la FDA a publié sur son site les récents rappels de lots, dont une grande partie est en rapport avec ce sujet : la présence dans les flacons de particules visibles issues du procédé de fabrication a amené Alexion à rappeler 9 lots de Soliris®.

Par ailleurs, Hospira a rappelé un lot de Marcaïne® en raison de la présence de particules visibles, dont l'origine est imputée au fournisseur des flacons. Et enfin, Bristol Mayer Squibb a dû rappeler 6 lots de Coumadine® suite à des investigations menant à la découverte de particules dans des échantillons témoins.

Pour conclure, et au vu des préoccupations des cliniciens, et des difficultés rencontrées par les entreprises quant à la maîtrise des processus de fabrication ou la stabilité des médicaments qui conduisent à la présence de particules, il convient de développer des méthodes de contrôle qualité adaptées à la quantification de la contamination particulaire pour intercepter toute non-conformité liée à ce paramètre critique, et mettre sur le marché des produits de la qualité requise, dans le but de soigner le patient tout en assurant sa sécurité.

¹ Shay et al. *Infec. Cont. and Hosp. Epid.* 1997 vol. 18, pp. 814-817 - Hill et al. *J. Parent. Ent. Nutri.* 1996 vol. 20, pp. 81-87

² Bradley et al. *Pediatrics* 2009 vol. 123, pp. 609-613 - FDA Drug Safety Newsletter 2009 vol. 2, pp. 24-25.

³ Cant et al. *Brit. Med. Jour.* 1988, vol. 296, pp. 968-969.

⁴ Puntis et al. *Arch. Dis. Child.* 1992. Vol. 67 pp.1475-1477.

⁵ Driscoll, Ling, Quist, Bristrian. 2005. *Pathological consequences from the infusion of unstable lipid emulsion admixtures in guinea pigs.*

⁶ Driscoll, Ling, Andreresson, Bristrian. 2009. *Hepatic indicators of oxidative stress and tissue damage accompanied by systemic inflammation in rats following a 24-hour infusion of an unstable lipid emulsion admixture.*

*« Tout est poison
Rien n'est poison
Seule la quantité fait le poison »
Paracelse*

Table des matières

LISTE DES ENSEIGNANTS DE L'UFR DE PHARMACIE	I
REMERCIEMENTS	IV
DEDICACE	VI
AVANT-PROPOS	VII
TABLE DES MATIERES	IX
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	XI
LISTE DES ABREVIATIONS	XIII
GLOSSAIRE	XIV
1. INTRODUCTION	2
2. ELEMENTS DE THEORIE	4
2.1 CIRCULATION SANGUINE ET VOIE PARENTERALE	4
2.1.1 <i>Définition et intérêt de la voie parentérale</i>	4
2.1.2 <i>Caractéristiques des médicaments destinés à l'usage parentéral</i>	4
2.1.3 <i>Circulation sanguine : destination des médicaments</i>	5
2.2 LES PARTICULES DANS LES MEDICAMENTS	6
2.2.1 <i>Introduction</i>	6
2.2.2 <i>Survol historique de la réglementation des médicaments destinés à l'usage parentéral</i>	7
2.2.3 <i>Effets cliniques des particules</i>	8
2.2.4 <i>Retraits de lots dus à la présence de particules</i>	8
2.2.5 <i>Origines et mesures de réduction des particules</i>	9
2.2.6 <i>Classification des particules</i>	11
2.2.7 <i>Limite de visibilité de l'œil humain</i>	11
2.2.8 <i>Comptage des particules</i>	12
2.3 METHODE DE CONTROLE QUALITE	15
2.3.1 <i>Définition et types de méthodes :</i>	15
2.3.2 <i>Gestion du risque de données incorrectes</i>	15
2.3.3 <i>Cycle de vie d'une méthode</i>	17
2.3.4 <i>Validation de méthode</i>	17
3. MATERIEL ET METHODE	23
3.1 OBJECTIFS GENERAUX	23
3.2 DESCRIPTION DES POCHEs	23
3.3 PRODUCTION DES POCHEs	24
3.3.1 <i>Formage des poches</i>	24
3.3.2 <i>Insertion des systèmes de fermeture</i>	24
3.4 MODE D'UTILISATION AU LIT DU PATIENT	25
3.5 LA METHODE D'ANALYSE	26
3.5.1 <i>Etapas de la méthode</i>	28
3.5.2 <i>Les particules analysées</i>	31
3.6 ANALYSE DE RISQUE	31
3.7 OPTIMISATION DE LA METHODE	36
3.7.1 <i>Recommandation d'amélioration continue</i>	36
3.7.2 <i>Optimisation du taux d'extraction des particules</i>	37
3.8 VALIDATION DE METHODE	58

3.8.1	<i>Introduction</i>	58
3.8.2	<i>Méthode</i>	58
3.8.3	<i>Résultats</i>	63
3.8.4	<i>Discussion</i>	63
4.	DISCUSSION GENERALE	69
4.1	PERSPECTIVES :	72
5.	CONCLUSION	74
	BIBLIOGRAPHIE	75
	ANNEXES	79
	LE SERMENT DES APOTHICAIRES	92
	RESUME	93

Liste des tableaux et figures

Tableaux

Tableau I	Principaux polymères utilisés dans l'industrie pharmaceutique
Tableau II	Principaux paramètres de la méthode 2 (Monographie 2.9.19 de la Ph. Eur. 8.2)
Tableau III	Principales différences entre les deux méthodes compendiales de comptage des particules
Tableau IV	Limites des particules non visibles
Tableau V	Critères classiques utilisés dans la validation de méthode
Tableau VI	Durée de réalisation de l'analyse par étape d'une poche pour perfusion
Tableau VII	Correspondances entre surface et diamètre équivalent d'une particule
Tableau VIII	Description détaillée de la méthode d'analyse des poches pour perfusion
Tableau IX	Evaluation du risque de contamination sur les principales étapes de la méthode de test
Tableau X	Facteurs de biais de surévaluation et sous-évaluation
Tableau XI	Prélèvement et dilution du standard
Tableau XII	Résultat par blocage de la lumière de l'évaluation du standard externe
Tableau XIII	Analyse de risque de contamination particulière durant le procédé de production
Tableau XIV	Résultat par blocage de la lumière de l'évaluation du standard externe
Tableau XV	Résultat par filtration sur membrane de l'évaluation du standard externe
Tableau XVI	Comparaison entre les 2 types de standards (externe et interne)
Tableau XVII	Comparaison entre la méthode de test et le protocole de développement de la méthode de quantification du standard interne
Tableau XVIII	Comparaison entre la 1 ^{ère} extraction et les neuf suivantes lors du protocole de développement d'une méthode de quantification du standard interne
Tableau XIX	Nombre de particules extraites et taux de recouvrement lors de 10 extractions successives
Tableau XX	Nombre de particules extraites et taux de recouvrement de 6 extractions successives
Tableau XXI	Quatre conditions du test d'optimisation de solvant
Tableau XXII	Conditions testées pour l'optimisation de la méthode
Tableau XXIII	Gamme de conformité par tranches de taille de particules
Tableau XXIV	Evaluation des critères de validation de la méthode
Tableau XXV	Récapitulatif des critères de validation mis en place
Tableau XXVI	Récapitulatif du protocole de validation
Tableau XXVII	Matrice des échantillons par critère de validation
Tableau XXVIII	Résultats du critère d'exactitude
Tableau XXIX	Résultats du critère de précision
Tableau XXX	Résultats du critère de précision intermédiaire (pour chaque série)
Tableau XXXI	Résultats du critère de précision intermédiaire (entre les 3 séries)
Tableau XXXII	Résultat des taux de recouvrement (approche alternative)
Tableau XXXIII	Evaluation des critères de validation (approches alternative)
Tableau XXXIV	Recouvrement des proportions de particules contenues dans les volumes filtrés (500-2000ml)
Tableau XXXV	Ratio entre le dénombrement partiel extrapolé et le dénombrement total (500ml)
Tableau XXXVI	Dérogations de la méthode aux textes de références

Figures

Figure n° 1	Poche de perfusion comprenant 3 compartiments
Figure n° 2	Illustration du premier passage hépatique
Figure n° 3	Illustration des diamètres des vaisseaux sanguins (d'après Pearson)
Figure n° 4	Illustration de la circulation sanguine (d'après Widmaier)
Figure n° 5	Proportions des motifs de retraits de lots publiés par la FDA en 2013 et 2014
Figure n° 6	Illustration de la limite de visibilité (d'après Aldrich)
Figure n° 7	Diagramme illustrant le principe de blocage de la lumière (d'après Groves)
Figure n° 8	Microphotographies de particules communément analysées, respectivement de gauche à droite : du polyéthylène, du carbonate de calcium, et des parties d'insecte (d'après Barber)

Figure n° 9	Illustration des étapes classiques d'une méthode d'analyse (d'après Amarouche)
Figure n° 10	Diagramme des 5 M
Figure n° 11	Schématique typique du management de risques (d'après l'ICH Q9)
Figure n° 12	Processus de validation d'une méthode (Norme ISO 17025) (d'après Amarouche)
Figure n° 13	Concept de base de la validation: valeur de référence et limite d'acceptabilité (d'après Feinberg)
Figure n° 14	Schéma résumant le cycle de vie d'une méthode analytique
Figure n° 15	Schéma de la composition du film plastique des poches souples
Figure n° 16	Illustration du design d'une poche pour perfusion à trois compartiments
Figure n° 17	Rupture des soudures pelables d'une poche multi-compartiments (documentation B.Braun)
Figure n° 18	Mélange du contenu d'une poche multi-compartiments (documentation B.Braun)
Figure n° 19	Préparation de l'infusion pour l'administration au patient (documentation B.Braun)
Figure n° 20	Illustration de l'analyse partielle de la membrane de filtration
Figure n° 21	Enceinte à flux laminaire prête pour une session de travail
Figure n° 22	Schéma simplifié de la méthode de comptage des particules dans les poches
Figure n° 23	Photographie sous microscope de membrane après filtration de solution (Grossissement à 90 fois)
Figure n° 24	Illustration du risque d'erreur inhérent au facteur humain
Figure n° 25	Photo d'un filtre présentant une probable contamination pendant l'étape de séchage (Grossissement à 90 fois)
Figure n° 26	Diagramme d'Ishikawa représentant les principales sources de contamination secondaire
Figure n° 27	Illustration de l'amélioration continue au niveau du filtre de porosité 0.2 µm
Figure n° 28	Illustration de l'amélioration continue au niveau du découpage
Figure n° 29	Photographie par microscopie d'une partie de membrane contenant une particule et une imperfection (Grossissement à 90 fois)
Figure n° 30	Illustration des valeurs expérimentale et de référence
Figure n° 31	Photographie des billes de polystyrène vue sous microscope au grossissement x90
Figure n° 32	Diagramme représentant les principales sources de contamination en zone de production
Figure n° 33	Vue sous le microscope au grossissement de 20 fois des particules du standard interne (à droite) et celles analysées en routine (à gauche).
Figure n° 34	Illustration des valeurs expérimentale et de référence, déterminée après N rinçages
Figure n° 35	Illustration d'une poche pour perfusion avant la 1 ^{ère} extraction (à gauche) et avant chacune des 9 extractions suivantes (à droite)
Figure n° 36	Profil d'extraction des particules au cours des rinçages successifs (poche 1)
Figure n° 37	Profil d'extraction des particules au cours des rinçages successifs (poche 2)
Figure n° 38	Profil d'extraction des particules au cours des rinçages successifs (poche 3)
Figure n° 39	Illustration schématique de l'extraction des particules au fur et à mesure des rinçages successifs, avec présence d'un bruit de fond de contamination secondaire
Figure n° 40	Comparaison des taux d'extraction moyens des quatre solvants test ANOVA (à l'aide du logiciel Minitab)
Figure n° 41	Logigramme résumant les principales étapes et conclusions de l'optimisation de méthode
Figure n° 42	Schématique des tests réalisés sur chaque poche
Figure n° 43	Distribution autour de la cible des recouvrements par échantillon

Liste des abréviations

5 M	5 thèmes : moyens, méthode, milieu, matière, main d'œuvre
AMDEC	Analyse des modes de défaillances, de leurs effets et leur criticité
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANOVA	Analyse de Variance
BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication
CV	Coefficient de variation
CFR	« <i>Code of Federal Regulation</i> », code de la réglementation fédérale (USA)
ECA	« <i>European Compliance Academy</i> », Académie Européenne de la Conformité
EPPI	Eau Pour Préparations Injectables
FDA	« <i>Food and Drug Administration</i> », Administration de l'agroalimentaire et des médicaments (USA)
GMP	« <i>Good Manufacturing Practices</i> », Bonnes Pratiques de Fabrication
HEPA	« <i>High Efficiency Particulate Air</i> », filtre à particule aériennes à haute efficacité
HLB	« <i>Hydrophilic Lipophilic Balance</i> », Balance Hydrophile-Lipophile
HVAC	« <i>Heating, Ventilation and Air-Conditioning</i> », Chauffage, Ventilation et Climatisation
ICH	« <i>The International Conference on Harmonization</i> », Comité International pour l'Harmonisation
IPC	« <i>In Process Control</i> », contrôle en cours de procédé
IM	Intra-Musculaire
ISO	« <i>International Organization for Standardization</i> », Organisation International pour la Standardisation
IV	Intra-Veineuse
JP	« <i>Japanese Pharmacopoeia</i> », Pharmacopée Japonaise
NIST	« <i>National Institute of Standards and Technology</i> », Institut National des Standards et de la Technologie
OOE	« <i>Out Of Expectations</i> », (Résultat) Non Attendue
PA	Principe actif
PDA	« <i>Parenteral Drugs Association</i> », Association pour les Médicaments destinés à l'usage parentéral
Ph. Eur.	Pharmacopée Européenne
PQRI	« <i>Product Quality Research Institute</i> », Institut de Recherche sur la Qualité des Produits
RCP	Résumé des Caractéristique du Produit
ROW	« <i>Reverse Osmose Water</i> », eau purifiée par osmose inverse
USP	« <i>United State Pharmacopoeia</i> », Pharmacopée des Etats-Unis
ZAC	Zone à Atmosphère Contrôlée

Glossaire

Actions correctives et préventives (CAPA)	système d'implémentation d'action correctives et préventives résultat d'une investigation suite à des réclamations, rejets de lots, non-conformité, rappel de lots, déviation, audits et autres inspections, tendances de procédé et monitoring de qualité des produits
Compendial	se dit d'une méthode qui est fourni dans une monographie de la pharmacopée
Contamination	terme générique qui désigne la présence non désirée d'un matériau dans un lieu
Danger	source potentielle de dommage, de préjudice ou d'effet nocif
Délamination	formation de lamelles à partir d'une matière, ou d'un matériau macromoléculaire
Déviaton	action de dévier, prendre une direction qui s'écarte de la ligne déterminée à l'avance
Effet indésirable	réaction nocive et non recherchée, susceptible d'être liée à l'utilisation d'un produit de santé pouvant être d'intensité variable
Effet indésirable grave	effet indésirable d'intensité majeure pouvant prolonger une hospitalisation, entraînant une invalidité importante ou durable, ou susceptible de mettre la vie en danger
Filtrat (ou perméat)	molécules et/ou particules qui passent à travers la membrane lors du procédé de filtration sur membrane
Formage	transformation des matières premières plastiques par modification de la forme de feuilles ou de plaques (Larousse)
HLB	« <i>Hydrophilic Lipophilic Balance</i> », ou balance hydrophile-lipophile, grandeur caractéristique d'un tensioactif, qui varie de 0 à 20 non incluses. Plus la valeur est élevée, plus le tensioactif est hydrophile
Infarctus	mort brutale et massive de cellules, en rapport avec un manque d'oxygène suite à l'interruption de la circulation artérielle. L'infarctus le plus connu est celui du myocarde (muscle cardiaque)
IPC	« <i>In Process Control</i> », contrôle en cours de production réalisé afin d'ajuster si nécessaire le procédé pour assurer que le produit est conforme à ses spécifications
Lot	quantité spécifique d'un médicament supposée avoir une qualité et des caractéristiques uniformes dans les limites spécifiées, et produite selon un cycle de production unique
Poche de perfusion	réipient rempli à sa capacité nominale avec la solution pour perfusion, muni de l'identification pour le stockage et pour l'administration parentérale de la solution pour perfusion
Poche pour perfusion	réipient vide avec identification convenant à la réception, au stockage et à l'administration de la solution pour perfusion
Retrait de lot	mesure urgente de protection de santé publique visant à retirer du marché un produit pharmaceutique. Chaque titulaire d'AMM doit implémenter des procédures de rappel des lots défectueux produits
Remplissage vasculaire	technique médicale consistant à perfuser un soluté dans la circulation sanguine afin d'augmenter la volémie. Il s'agit d'une thérapeutique d'urgence en cas d'hypovolémie au cours d'un choc, pouvant mettre en jeu le pronostic vital

Rétentat	molécules et/ou particules retenues par la membrane lors du procédé de filtration sur membrane
Standard de référence	un standard de référence, ou matériaux de référence, est une substance préparée pour une utilisation en tant que standard dans un test, identification, ou test de pureté. Il doit avoir la qualité appropriée à utilisation envisagée, pour laquelle il est souvent caractérisé et évalué par des procédures additionnelles autre que celles utilisées en routine
Valeur de référence	valeur d'une grandeur, dont l'incertitude de mesure associée est considérée communément comme suffisamment petite pour que la valeur puisse servir de base de comparaison pour les valeurs de même nature
Vérification	fourniture de preuves tangibles qu'une entité donnée satisfait à des exigences spécifiées

Titre **1**

Introduction

1. Introduction

Le laboratoire B.Braun est un groupe non coté en bourse, appartenant à une famille allemande. Il est présent depuis 170 ans dans les domaines de la conception, de la production et de la commercialisation de matériel médico-chirurgical et de médicament. [1]

Il possède 46 sites de production dans le monde, dont celui de Crissier (Vaud, Suisse) qui est un centre d'excellence spécialisé dans les médicaments pour la nutrition parentérale, les solutions de remplissages vasculaires et les systèmes de conditionnement primaire et secondaire en plastique.

Dans le cadre de ce travail de recherche, on s'intéresse principalement aux conditionnements primaires, qui sont des poches pour perfusion faites principalement de polyoléfine, fabriquées vides dans un premier temps, puis contrôlées.

Le processus de production des poches pour perfusion vides implique le contrôle qualité dans un premier temps, qui consiste en des tests physiques dont le dénombrement des particules non-visibles, objet principal de cette recherche. L'intérêt de ce contrôle est de maîtriser le niveau de contamination particulaire de départ avant remplissage par une solution de perfusion. Une limite en nombre de particules a été instaurée par B.Braun pour les produits vides et est équivalente à 40% des limites compendiales appliquées aux produits remplis. Ceci permet de laisser une marge de 60% à l'apport de la solution de perfusion qui ne peut en être exempte, ainsi qu'au processus de remplissage, et d'aboutir ainsi à un produit fini conforme.

Une fois la conformité avec les spécifications vérifiée, les poches vides sont libérées pour être remplies sur le site-même ou un autre site du groupe, où elles sont soumises à des nouveaux contrôles, dont le dénombrement des particules, avant d'être mises sur le marché.



Figure n° 1 – Poches de perfusion comprenant 3 compartiments

Au cours de son cycle de vie, la méthode de comptage des particules a subi des modifications majeures telles que :

- L'introduction de la deuxième méthode de la pharmacopée européenne (Ph.Eur.) à la place de la première [2]
- L'utilisation d'un tensioactif, le polysorbate 80 [3]

Les problématiques résultant de ces changements sont les suivantes :

A quel point les résultats sont-ils représentatifs de l'état de contamination particulaire effectif des poches pour perfusion analysés ?

Existe-t-il un biais, et le cas échéant, la méthode peut-elle être améliorée et optimisée de manière à être plus fiable ?

Titre **2**

Eléments de théorie

2. Eléments de théorie

2.1 Circulation sanguine et voie parentérale

2.1.1 Définition et intérêt de la voie parentérale

L'usage de la voie parentérale est incontournable dans la prise en charge des patients, et présente de nombreux avantages par rapport aux voies entérale et externe.

Elle trouve principalement son intérêt dans les situations d'urgence, en cas d'inconscience, ou encore lorsque le premier passage hépatique présente un risque de dégradation métabolique pour le principe actif.

L'administration parentérale du médicament permet alors de rendre le principe actif disponible directement dans la circulation générale, avec une biodisponibilité pouvant être absolue, et une action rapide. [4]

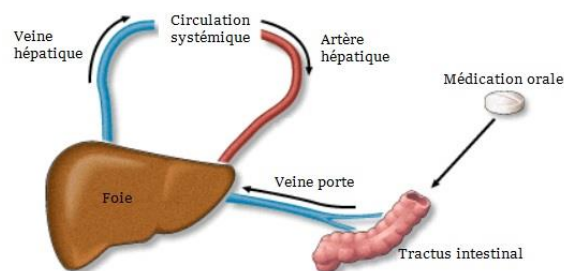


Figure n° 2 – Illustration du premier passage hépatique

L'adjectif « parentéral » est défini selon le dictionnaire Le Larousse, par opposition à l'administration entérale : qui s'administre par une voie autre que digestive. Celle-ci implique la résorption du principe actif à travers le tractus gastro-intestinal, et le conduit à travers le premier passage hépatique à la circulation sanguine. [5]

Il y a une définition plus restrictive d'après la monographie « Préparations parentérales » de la Ph. Eur. : [6]

Les médicaments parentéraux sont des préparations destinées à être injectées, perfusées ou implantées dans le corps humain ou animal.

Il existe de multiples voies d'abord de la circulation sanguine, dont les plus employées sont les voies intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée. Les voies intraartérielle et intracardiaque sont moins courantes. [4]

2.1.2 Caractéristiques des médicaments destinés à l'usage parentéral

Les médicaments destinés à la voie parentérale doivent satisfaire, de manière très rigoureuse, à plusieurs essais dont celui de la stérilité, de contamination particulaire et des endotoxines bactériennes. [6]

Pour préserver leur qualité, ces médicaments sont conditionnés dans des récipients en verre [7] ou des récipients fabriqués à partir d'un ou plusieurs polymères et peuvent contenir des additifs. Les plus utilisés sont le polyéthylène, le polypropylène, et le poly(chlorure de vinyle). Ils se présentent sous forme de poches flexibles ou flacons moulés, et sont étiquetés afin de permettre l'identification et la traçabilité. [8]

Tableau I – Principaux polymères utilisés dans l'industrie pharmaceutique [9]

Symbole normalisé	Nom chimique	Formule chimique
PE	Polyéthylène	$-(CH_2-CH_2-)_n$
PP	Polypropylène	$-(CH_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-)_n$
PVC	Poly-(chlorure de vinyle)	$-(CH_2-CHCl-)_n$
PS	Polystyrène	$-(CH_2-\underset{\text{C}_6\text{H}_5}{\text{CH}}-)_n$
PA	<u>Polyamides :</u> PA 6 PA 7 PA 8 PA 9 PA 11 PA 6-6 PA 6-10	$-(OC-(CH_2-)_5NH-)_n$ $-(OC-(CH_2-)_6NH-)_n$ $-(OC-(CH_2-)_7NH-)_n$ $-(OC-(CH_2-)_9NH-)_n$ $-(OC-(CH_2-)_4CO-NH-(CH_2-)_6NH-)_n$ $-(OC-(CH_2-)_8CO-NH-(CH_2-)_6NH-)_n$

D'après le code du 21 CFR, ces conditionnements ne doivent pas altérer la qualité des médicaments qu'ils conditionnent par rapport aux spécifications établies. [10]

Dans le cas de la contamination particulaire, cela signifie que les récipients vides doivent y contribuer le moins possible.

Le récipient en plastique vide, sujet principal de cette thèse, est défini dans la norme ISO 15747 : [11]

**Récipient nu avec identification convenant à la réception, au stockage
et à l'administration de la solution pour injection**

2.1.3 Circulation sanguine : destination des médicaments

Les médicaments administrés par voie parentérale se retrouvent directement dans la circulation sanguine. Celle-ci forme une boucle fermée, composée de deux circuits qui naissent et se terminent dans le cœur : [12]

- La circulation pulmonaire où tout le sang est pompé par le ventricule droit à travers les poumons puis revient dans le ventricule gauche.
- La circulation systémique qui part du ventricule gauche, passe à travers tous les organes et tissus de l'organisme – à l'exception des poumons – puis se termine dans le ventricule droit. Chaque organe reçoit alors une fraction du sang, comme le foie, la rate, l'intestin, les reins, le cerveau ...etc.

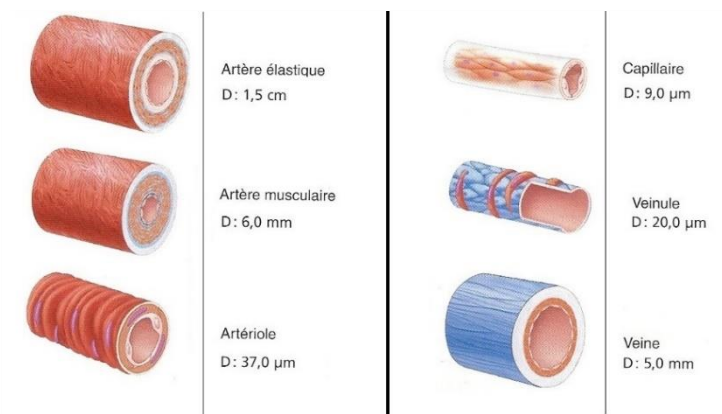


Figure n° 3 – Illustration des diamètres des vaisseaux sanguins (d'après Pearson)

Dans les deux circulations, les vaisseaux en s'éloignant du cœur se ramifient à un degré extraordinaire donnant un nombre considérable de très petits vaisseaux, **les capillaires**, dont les plus fins présentent un diamètre interne d'environ 9 µm [13]. Ces derniers se réunissent ensuite pour former de plus gros vaisseaux en rejoignant le cœur.

Au vue de cette arborisation et des diamètres faibles des capillaires sanguins qui irriguent les organes de l'organisme humain, il est aisé de comprendre les dégâts que peuvent engendrer des particules solides introduites involontairement dans ce système.

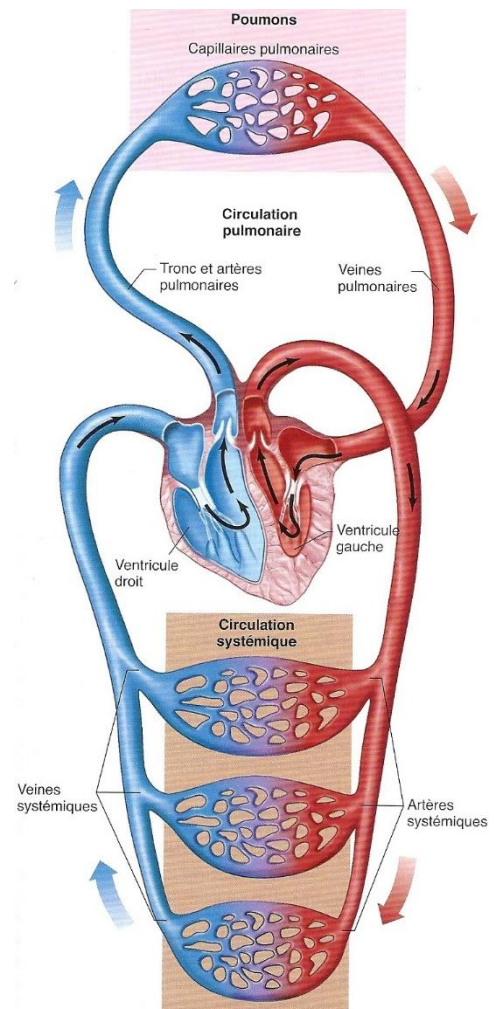


Figure n° 4 – Illustration de la circulation sanguine (d'après Widmaier)

2.2 Les particules dans les médicaments

2.2.1 Introduction

De manière générale, le mot « particule » trouve plusieurs significations dans la littérature scientifique selon le domaine concerné : chimie, physique, thermique ...etc.

Ainsi, dans le domaine pharmaceutique, la définition est donnée par la Ph. Eur. : [2]

« [...] particules étrangères, non dissoutes et mobiles, autres que des bulles de gaz, qui ont été involontairement introduites »

Les praticiens de santé et les agences réglementaires sont très au fait de l'impossibilité de fabriquer des médicaments complètement exempts de particules [14], quand bien même cela serait souhaitable et que les procédés de mise en forme pharmaceutique soient en constante amélioration pour tendre vers cet état de fait. [15]

Depuis plus de 30 ans [16], les congrès se multiplient, réunissant d'éminents experts comme Scott Aldrich et Stephen Langille, pour discuter les problématiques de contamination particulaire rencontrés, ainsi que l'état de l'art en matière de nouvelles technologies de caractérisation et de réduction du risque de contamination.

L'association A3P [15] s'intéresse particulièrement aux particules visibles via des groupes de travail d'intérêt commun visant à évaluer, prévenir et réduire la contamination particulaire lors des procédés de fabrication. L'USP organise également des séminaires pour répondre aux problèmes récurrents posés par les industries de la santé, ainsi que la prestigieuse Académie Européenne de Conformité (ECA) [14] qui organise annuellement une conférence intitulée *Particles In Parenterals* (particules dans les médicaments destinés à l'usage parentéral) pour en discuter les sujets d'actualité et les perspectives. [17]

Thomas Barber (2000) a entièrement dédié un ouvrage à ce sujet, et selon lui, ces problématiques sont apparues dès l'introduction des préparations injectables dans les pharmacopées. [18]

2.2.2 Survol historique de la réglementation des médicaments destinés à l'usage parentéral

A l'un des derniers congrès de l'ECA, qui s'est tenu à Vienne en Mai 2013, Aldrich a donné quelques repères historiques qui ont marqué l'évolution de la réglementation des médicaments en termes de contamination particulaire : [17]

- 1905** Première référence aux solutions parentérales dans l'USP. Aucune mention sur la contamination particulaire
- 1949** Publication dans la littérature scientifique de plusieurs événements indésirables graves incriminant les particules injectées
- 1949** L'inspection visuelle est introduite, avec des précautions pour éviter la contamination des médicaments injectables
- 1965** Première norme limitant le nombre de particules, émise par le *National Biological Standards Laboratory* (Canberra, Australie) qui a stimulé les activités menant à l'actuelle limitation.
- 1973** Turco et Davis révisent les conséquences cliniques des particules injectées
- 1974** Révision des limites en Australie et Grande-Bretagne, puis aux Etats-Unis (l'USP se base sur les études de la PDA en collaboration avec d'autres organismes) :

Grande-Bretagne	Australie	Etats-Unis
1000 particules/ml \geq 2 μ m	1000 particules/ml \geq 2 μ m	50 particules/ml \geq 10 μ m
100 particules/ml \geq 5 μ m	250 particules/ml \geq 3.5 μ m	5 particules/ml \geq 25 μ m
	100 particules/ml \geq 5 μ m	
	25 particules/ml \geq 10 μ m	
	2 particules/ml \geq 20 μ m	

- 1984** Les 2 méthodes (blocage de la lumière et microscopie) sont révisées :
 - Les préparations de grand volume sont analysées par microscopie
 - Les préparations de petit volume sont analysées par blocage de la lumière, et ont de nouvelles limites : 10 000 particules/ml \geq 10 μ m et 1000 particules/ml \geq 25 μ m.
- 1990** L'USP définit de nouvelles limites selon le volume de la préparation :
 - Grand volume (> 100 ml) : 25 particules/ml \geq 10 μ m et 3 particules/ml \geq 25 μ m
 - Petit volume (< 100 ml) : 10 000 particules/ml \geq 10 μ m et 1000 particules/ml \geq 25 μ m
- 1995** L'USP hiérarchise les 2 méthodes : le blocage de la lumière est préféré à la microscopie en raison de la facilité, objectivité, efficacité, et expérience historique de la méthode. Les limites révisées sont toujours en vigueur dans la version actuelle de l'USP.
- 2007** Les 3 principales pharmacopées (Ph. Eur., USP, JP) harmonisent le chapitre <788> de l'USP

Les limites réglementaires ont donc considérablement évolué au fil de l'amélioration des méthodes d'analyse et de quantification des particules, ainsi que des découvertes scientifiques de leur impact médical.

2.2.3 Effets cliniques des particules

Dans un ouvrage intitulé « *Particle Toxicology* » (toxicologie des particules) [19], une communauté de chercheurs détaille les mécanismes physiopathologiques engendrés par les particules, notamment les interactions avec les membranes cellulaires, l'inflammation, le stress oxydatif, la fibrose pulmonaire, ainsi que les effets génotoxiques et immunitaires.

Le Dr. Langille liste les effets cliniques les plus couramment observés suite à l'injection accidentelle de particules : [20]

- L'occlusion, thrombose, phlébite, et embolie
- L'inflammation, les réactions antigéniques et immunologiques
- Les granulomes, les fibroses, ou enfin la mort

Selon lui, ils dépendent de plusieurs facteurs de risques dont :

- le nombre et la nature des particules
- l'âge du patient, ainsi que son alitement qui ralentit la circulation sanguine
- et enfin, la voie d'administration

En effet, les particules injectées par voie IM sont moins dangereuses en raison de l'efficacité de la réponse immunitaire tissulaire qui met en place rapidement la phagocytose et l'immobilisation. [18]

A contrario, les particules injectées par voie IV arrivent dans la circulation générale et suivent selon toute logique le circuit du sang en se dirigeant vers le lit capillaire pulmonaire, où elles seront théoriquement piégées.

Le poumon dispose également de ses propres mécanismes de défense, mais ceux-ci peuvent être dépassés en cas de forte contamination particulaire, ou si les particules présentent une taille importante : par exemple, au-delà de 50 µm, les particules sont plus enclines à s'y loger. Celles de plus petite taille sont plutôt susceptibles d'être bloquées au niveau du foie ou de la rate.

En 1955, Bruning décrit 19 cas d'autopsie présentant des fibres et des particules cristallines dans les vaisseaux pulmonaires entourées par la réaction immunitaire.

Sarrut et Nezelof ont traité en 1960 de 25 cas de lésions artérielles, caractérisés par la présence de macrophages dû à la contamination par des fibres de coton.

Garvan et Gunner ont été, selon Barber, les précurseurs des études cliniques sur les particules. En 1963, ils ont quantifié et classé les particules retrouvés dans des médicaments en Australie. Et en 1964, ils ont présenté leur conclusion sur leurs effets indésirables, basée sur des expériences sur lapin, et des dissections de poumons humains post-mortem.

2.2.4 Retraits de lots dus à la présence de particules

La présence de particules dans la médication parentérale peut donc avoir un effet indésirable grave, pouvant mener à la mort des patients. Cela explique l'attention particulière qu'elle reçoit de la part des praticiens de santé qui considèrent, à tort ou à raison, ce paramètre comme l'indicateur principal de la qualité des médicaments destinés à la voie parentérale, bien qu'il fasse partie d'un plus large panel d'attributs, tel que la stérilité, l'osmolarité, ou encore le pH. [18]

La facilité de détection des particules par une simple inspection - lorsqu'elles sont visibles à l'œil nu - en fait un motif répétitif de réclamations qui pousse les autorités de santé à imposer des mesures

correctives pouvant aller au retrait de lot. Ces mêmes mesures peuvent être également prises volontairement par les industries de santé à des fins préventives en cas de constatation de non-conformités.

Afin de situer le travail de cette thèse dans son contexte international, la figure n°5 résume les cas de retraits de lot du marché publiés sur le site de FDA [21] depuis 2013 et jusqu'à Septembre 2014 (annexe 1).

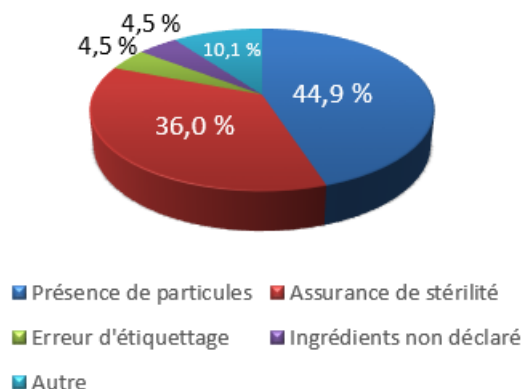


Figure n° 5 – Proportions des motifs de retraits de lots publiés par la FDA en 2013 et 2014

On peut voir que la présence non conforme des particules constitue 44,9% des motifs de retraits de lots, devant les diverses problématiques de stérilité, les erreurs d'étiquetages, la détection d'ingrédients non déclarés...etc.

En 21 mois, pas moins de 214 lots de produits pharmaceutiques ont été retirés du marché autant en raison de la présence de ces particules que pour tous les autres motifs confondus. La nature et la taille des particules varient considérablement, on retrouve principalement des particules de verre, d'oxyde de fer et des filaments de cellulose et de polyester.

En Août 2014, Cubist Pharmaceuticals a rappelé pas moins de 107 lots de Cubicin® en raison d'une potentielle présence de particules de verre. En Septembre 2014, le laboratoire Hospira a confirmé suite à une réclamation la présence d'une fraction de cheveu humain dans un flacon unique d'Héparine, tandis qu'en Octobre 2013, il s'agissait d'une particule de 3 mm d'oxyde de fer dans un flacon de Marcaïne®.

La présence de telles particules peut sembler impressionnante compte tenu de la destination des médicaments qui les véhiculent directement dans le sang, mais elle n'est que le reflet de la quantité infinie des particules provenant de différentes sources qu'elles soient environnementales ou pas, et de la difficulté à les maîtriser, quand bien même les industries veillent à implémenter des moyens pour empêcher la contamination particulières des produits pharmaceutiques.

2.2.5 Origines et mesures de réduction des particules

Les industries du médicament doivent obligatoirement suivre une hiérarchie complexe de règlements, normes et standards pour maîtriser la contamination particulaire, déterminée par la contribution de plusieurs sources, environnementale, anthropiques ou encore endogènes, dont on en retiendra les six principales : [18]

1. D'abord, **l'environnement** qui est une source très importante de particules de toutes natures, et sa réduction est maîtrisée par la production dans des locaux adaptés selon les BPF, tels que les salles blanches, et la classification des zones décrites dans la norme ISO 14644-1 (annexe 2).

Des mesures rigoureuses sont également mises en place telles que :

- Systèmes d'épuration de l'air approvisionné, appelés *HVAC*, et gradients de pression atmosphérique
 - Stations de travail minimisant la génération de particules et approvisionnement d'air en flux laminaire filtré (*HEPA*)
 - Sélection des équipements et matériels à haute résistance à l'abrasion
 - Et autres contrôles environnementaux périodiques ...etc.
2. **L'activité humaine** est un facteur non négligeable, bien que l'habillement spécifique des opérateurs (combinaison, gants...etc.) présente une haute résistance à l'abrasion, les fibres de cellulose qui les composent persistent comme source particulaire communément identifiée. [18] [22]

Sa minimisation est également réalisée de manière indirecte par la réduction du personnel en ZAC, la formation des opérateurs à une gestuelle lente générant peu de turbulences, le monitoring environnemental et les procédures gérant l'activité.

Selon Barber [18], la contamination particulaire induite par le personnel dépend de l'environnement de travail et présente, par exemple en laboratoire, les proportions suivantes :

≥ 10 µm	≥ 50 µm
70 %	30 %

3. **Les procédés de production** et de mise en forme pharmaceutique dont la maîtrise passe par la propreté et la conception adéquates du procédé incluant machinerie et locaux. La filtration en ligne des solutions fabriquées est également un moyen dont l'efficacité est largement prouvée. [20]
4. **Le conditionnement** (ou contenant) qui peut être produit et fourni avec un certain niveau de contamination, ou contribuer à en générer lors de phénomènes de délamination ou d'éclats de verre. Selon Renger les facteurs d'aggravation sont la rugosité des surfaces intérieures dont les sommets peuvent être sujets à l'abrasion. [22]

Il est important que la contamination des conditionnements servant à la mise en forme pharmaceutiques soit réduite au maximum. Son élimination par rinçage n'est efficace que pour les récipients en verre. Dans les autres cas, il s'avère moins efficace et généralement plus difficile à mettre en œuvre. [18]

5. La composition de **la formulation** (ou contenu) peut induire également la dégradation du produit ou la formation de particules dans les produits, qui sont des phénomènes complexes. Ils peuvent impliquer la dégradation, l'agrégation, l'agglomération, la précipitation, la cristallisation, ou encore la sédimentation.
6. **Les interactions contenu-contenant** sont plus difficiles à maîtriser. Elles requièrent des études de la qualité des composants du contenant, la consistance de ses matières premières et des tests de stabilité et de compatibilité. La littérature est notamment riche sur le sujet de ces interactions surtout avec le caoutchouc - des systèmes de fermeture -, et le *PQRI* publie régulièrement ses travaux et recommandations relatifs aux substances extractibles et migrantes. [18]

En considérant le procédé de thérapie parentérale dans sa globalité, d'autres sources doivent être prises en considération : [18]

7. **Les dispositifs** et autres tubulures utilisés pour l'administration des préparations parentérales, tel que les seringues et aiguilles.
8. **Les manipulations** des médicaments par le personnel hospitalier ou le patient, tel que les reconstitutions, l'ouverture des ampoules ou le trocardage.

9. **Les mélanges de médicaments** pouvant conduire à des incompatibilités physico-chimiques et mener à la formation de précipités, de cristaux ou de trouble. Un livre entier est dédié à ces problématiques, le *Trissel's Table* (Trissel et Leissing 1996) dont la 17^e édition est publiée en 2013, sous le titre *Handbook of Injectable Drugs*.

Les pratiques hospitalières d'administration peuvent inclure dans les dispositifs de perfusion des filtres en ligne d'une porosité de 0.2 μm ou 0.45 μm : des études ont démontré l'efficacité de la filtration finale d'une thérapie intraveineuse et des articles scientifiques mettent l'accent sur la nécessité de telles pratiques pour les patients en soins intensifs recevant des perfusions parentérales à répétition [23] [24]. Cependant, elles doivent prendre en considération l'affinité et le risque de liaison des principes actifs aux membranes filtrantes.

A la lumière des considérations énoncées, il est évident que des mesures protectrices doivent contrer toute source de particules potentielle à chaque étape du processus de la thérapie parentérale, et minimiser son impact.

Les limites compendiales semblent refléter la réalité des médicaments injectables qui contiennent inévitablement une faible quantité de particules, d'où l'importance de pouvoir correctement les identifier, caractériser et quantifier. [18]

2.2.6 Classification des particules

Les particules peuvent être classées selon plusieurs critères, leur origine ou morphologie : [18]

- La forme arrondie, ou allongée comme une fibre
- La surface peut être régulière ou rugueuse
- La couleur peut varier selon la luminosité
- Leur nature chimique et leur viabilité également peuvent entrer en compte
- La taille et le diamètre, dont la détermination peut présenter des difficultés

De manière générale, l'unité de mesure des particules est le micron, 10^{-6} mètre.

1 μm constitue la frontière entre les particules fines ($< 1 \mu\text{m}$) et les autres. [18]

Dans la norme ISO 8871-3 (2004), les particules sont classées selon leur taille :

$\geq 2\mu\text{m}$ $\geq 5\mu\text{m}$ $\geq 10\mu\text{m}$ $\geq 25\mu\text{m}$ $\geq 50\mu\text{m}$ $\geq 100\mu\text{m}$

La Ph. Eur. cite deux classes de particules :

- Les particules visibles.
- Les particules non-visibles dont la taille peut être $\geq 10 \mu\text{m}$, $\geq 25 \mu\text{m}$.

2.2.7 Limite de visibilité de l'œil humain

Dans un séminaire de l'USP de 2010, Scott Aldrich [25] évoque une zone grise de croisement entre les domaines du visible et non-visible, couvrant l'intervalle de 25 μm à 150 μm . Mickael Mulkerrin admet que la limite de visibilité de l'œil humain est acceptable à 50 μm . [26]

Historiquement, cette valeur de 50 μm a toujours été admise d'après Barber, bien que l'inspection visuelle à l'œil nu soit sujette à de multiples sources d'erreurs incluant l'intensité lumineuse, le temps d'inspection, la subjectivité humaine et la fatigue. [18]

D'après ce dernier, Garvan et Gunner ont décrit en 1963 un appareillage d'inspection visuelle qui a permis de voir des particules d'environ 10 μm et même de 5 μm , apparaissant comme des tâches scintillantes de lumières, changeant de couleur selon l'angle d'éclairage.

Notons que la norme ISO 8871-3 classe les particules de taille $\geq 25\mu\text{m}$ parmi les particules visibles et que la Ph. Eur. n'apporte pas de précision à ce sujet. [27]

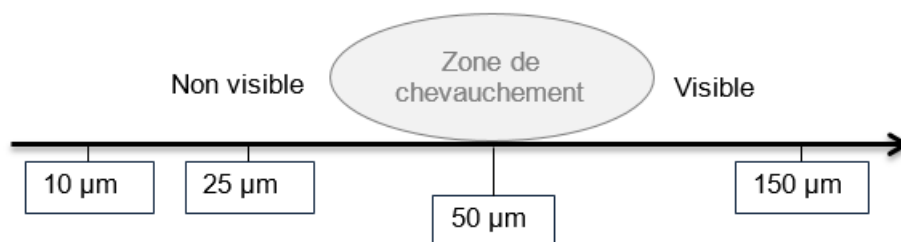


Figure n° 6 – Illustration de la limite de visibilité (d'après Aldrich)

Pour conclure, la limite de visibilité par l'œil humain est subjective et dépend de l'équipement utilisé. Elle se situe de manière générale entre 25 µm et 150 µm, avec une limite généralement admise par les scientifiques à 50 µm, sans exclure la possibilité de distinguer des particules de taille largement plus fine, avec une relation de proportionnalité entre la probabilité de détection d'une particule et sa taille.

Dans le cadre de ce travail, on s'intéresse particulièrement aux particules non visibles.

2.2.8 Comptage des particules

De manière générale, le comptage des particules est un test physique. [18]

L'ICH harmonise les textes des pharmacopées de la zone ICH, considérés comme interchangeables et équivalents pour la contamination particulaire non visible : [28]

Ph. Eur.	USP	JP
2.9.19	<788>	<6.07>

Notons que d'autres formes galéniques sont soumises à ce test : les médicaments ophtalmiques.

2.2.8.1 Remplissage du conditionnement vide

Les conditionnements vides doivent d'abord être remplis d'un liquide de rinçage avant l'analyse.

La norme ISO 15747 décrit les exigences tant physiques, chimiques que biologiques auxquels doivent se conformer les récipients en plastique vides durant les étapes de développement, y compris la contamination particulaire, détaillée dans son annexe A7.

Les conditionnements en plastique sont : [11]

- remplis d'eau (EPPI) filtrée à travers des pores de 0.2 µm
- traités selon l'utilisation envisagée (remplissage, stérilisation)
- stockés au moins 12 heures
- analysés par blocage de la lumière. Les résultats doivent être conformes aux limites compendiales.

La norme ISO 8871-3 [27], intitulée « Eléments en élastomère pour administration parentérale et dispositifs à usage pharmaceutique » traite dans sa troisième partie du dénombrement des particules libérées et des conditions de remplissage des poches vides, qui doivent être analysées dans une station à air propre correspondant à la classe ISO 8, tel que défini dans la norme ISO 14644-1⁷ (par exemple, une enceinte à flux laminaire), après remplissage d'eau exempte de particules :

- contenant 0.3×10^{-3} de polysorbate 80, pour le dénombrement des particules visibles où le liquide de rinçage est filtré sur une membrane de porosité maximale de 0.8 µm
- ou sans addition de polysorbate 80 pour le dénombrement des particules non visibles par blocage de la lumière.

Le rôle du polysorbate 80 est de mettre en suspension les particules pour les extraire des poches. On pourrait s'étonner de son inutilisation pour l'analyse par blocage de la lumière. Cela peut s'expliquer par le fait qu'il mousse, et que les bulles formées présentent un risque de biais.

⁷ La classe ISO 8 contient au maximum 3.52×10^6 de particules $\geq 0.5 \mu\text{m}$ et 832×10^3 de particules $\geq 1 \mu\text{m}$ et 293×10^3 de particules $\geq 5 \mu\text{m}$.

2.2.8.2 Revue des méthodes compendiales

Deux principales méthodes de comptage des particules sont détaillées dans la Ph. Eur. en vigueur : **Méthode 1** : basée sur le principe de blocage de la lumière, où un laser est fournie par une diode pour éclairer les particules suspendues dans la solution et un détecteur mesure le voltage résultant pour en déterminer la taille des particules. [18]

Les appareils classiques de comptage de particules, tel que Hiac Royco 9703 comptent les particules par intervalle de tailles :

$\geq 2 \mu\text{m}$ $\geq 5 \mu\text{m}$ $\geq 10 \mu\text{m}$ $\geq 25 \mu\text{m}$ $\geq 50 \mu\text{m}$ $\geq 100 \mu\text{m}$

Lors de la réalisation du test par cette méthode, un volume supérieur ou égal à 5 ml est prélevé à 4 reprises, le premier servant uniquement à rincer l'appareillage et les trois suivants à calculer un résultat moyen.

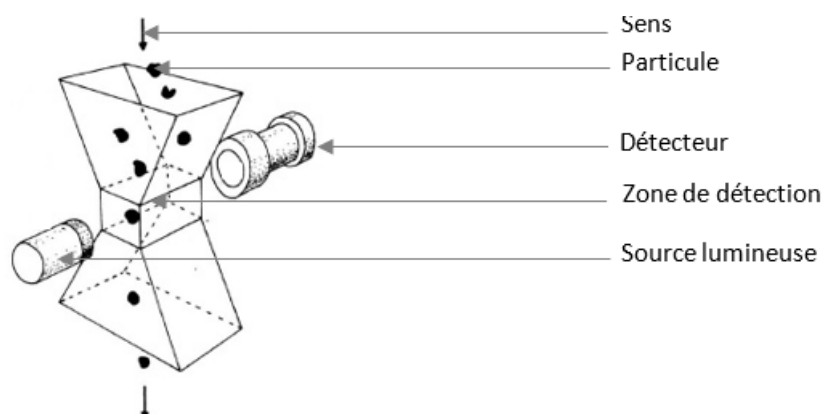


Figure n° 7 – Diagramme illustrant le principe de blocage de la lumière (d'après Groves)

Méthode 2 : basée sur le dénombrement par microscopie des particules retenues sur une membrane filtrante de porosité inférieure ou égale à 1.0 μm .



Figure n° 8 – Microphotographies de particules communément analysées, respectivement de gauche à droite : du polyéthylène, du carbonate de calcium, et des parties d'insecte (d'après Barber) [18]

Les paramètres principaux de cette méthode sont détaillés dans le tableau suivant :

Tableau II – Principaux paramètres de la méthode 2 (Monographie 2.9.19 de la Ph. Eur. 8.2)

Paramètre	Description résumée
Conditions du test	Conditions limitant la contamination particulaire (enceinte à flux laminaire)
Vérification des conditions du test	Analyse d'un témoin négatif pour confirmer que l'environnement est approprié, que l'eau est exempte de particules et que le matériel est nettoyé convenablement.
Matériel et verrerie ¹	Préalablement rincés à l'eau exempte de particules
Membrane filtrante	De couleur noire ou gris foncée, de porosité inférieure ou égale à 1.0 μm
Filtration	Filtration de la totalité du volume de l'échantillon

Paramètre	Description résumée
Séchage	Séchage des filtres dans des boîtes de Pétri partiellement fermées, au sein de l'enceinte à flux laminaire
Microscope	Microscope binoculaire équipé d'un micromètre
Eclairage	Deux illuminateurs permettant un éclairage épiscopique et oblique avec un angle de 10-20°
Grossissement	100 ± 10 fois
Comptage	Balayage de la membrane entière avec un possible comptage partiel suivi d'un calcul pour dénombrer les particules de tailles ≥ 10 µm et 25 µm.
Détermination de taille	Transformation mentale de l'image de chaque particule en un cercle et comparaison aux cercles de référence

¹ L'eau exempte de particules est obtenue par filtration de l'eau distillée à travers une membrane de porosité de 0.2 µm. [29]

Dans un ouvrage consacré à la microscopie pharmaceutique, Carlton [30] explique que le concept de diamètre sphérique équivalent est très commun pour la détermination de taille. Il est défini comme étant le cercle ayant la même surface projetée, et calculé selon la formule :

$$\text{diamètre équivalent} = 2 \times \sqrt{\frac{\text{Surface}}{\pi}}$$

Notons à titre indicatif qu'il existe de nombreuses autres méthodes de caractérisation des particules qui sortent du cadre de ce travail.

2.2.8.3 Comparaison des deux méthodes

Les principales différences entre les deux méthodes des pharmacopées sont résumées dans le tableau suivant : [30] [31]

Tableau III – Principales différences entre les deux méthodes compendiales de comptage des particules

Critère de comparaison	Méthodes compendiales	
	Méthode 1	Méthode 2
Principe d'analyse	Blocage de la lumière	Filtration sur membrane et microscopie
Temps d'analyse	Relativement court	Relativement lent, nécessitant des étapes de préparation d'échantillon
Facteur de biais	Bulles de gaz	Erreur de préparation d'échantillon, et d'analyse d'image microscopique
Détermination de taille	Répartition statistique par intervalle de taille	Taille précise pour chaque particule analysée
Distribution des tailles	Résolution modérée	Haute résolution
Estimation de la forme des particules	Rendement quantitatif	Rendement quantitatif et qualitatif

2.2.8.4 Les limites compendiales

Les médicaments destinés à la voie parentérale doivent être conformes aux limites de particules non visibles énoncées dans la pharmacopée. Celles-ci sont fonction du volume de la préparation parentérale et de la taille des particules :

Tableau IV – Limites des particules non visibles [2]

Volume de la préparation parentérale	Taille des particules	Méthode 1	Méthode 2
> 100 ml	≥ 10 µm	25 par ml	12 par ml
	≥ 25 µm	3 par ml	2 par ml
≤ 100 ml	≥ 10 µm	6000 par contenant	3000 par contenant
	≥ 25 µm	600 par contenant	300 par contenant

Notons que ces limites concernent les médicaments, et non leurs conditionnements vides, ces derniers n'ayant pas de limites propres.

2.3 Méthode de contrôle qualité

2.3.1 Définition et types de méthodes :

Pour répondre au besoin de contrôler la qualité des produits pharmaceutiques, il existe trois types de méthodes : [32]

- D'abord, les méthodes normalisées (ou compendiales) comme celles qui sont détaillées dans le précédent chapitre
- Les méthodes adaptées à partir de normes ou de textes de références et utilisées en dehors de leur application prévue
- Et enfin, les méthodes développées par le laboratoire

Une méthode peut être définie comme « la description générique de l'organisation logique des opérations mises en œuvre dans un mesurage ». Ces opérations peuvent être classées dans trois étapes classiques, telles que schématisées dans la figure ci-dessous :

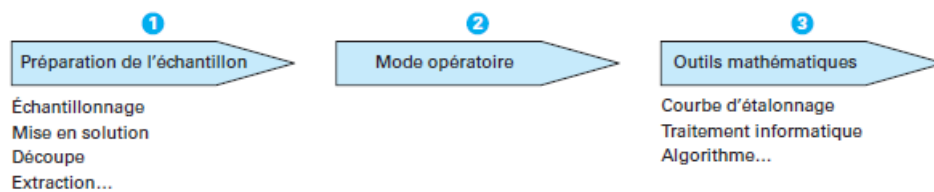


Figure n° 9 – Illustration des étapes classiques d'une méthode d'analyse (d'après Amarouche)

2.3.2 Gestion du risque de données incorrectes

Il existe un niveau de risque associé à chaque opération et à chaque étape. Une erreur ou un événement non attendu peuvent fausser le résultat de la méthode servant à contrôler les médicaments.

Il est nécessaire de maîtriser ce processus, afin de garantir le haut niveau de qualité et de pureté des médicaments, tel qu'exigé par les BPF et les agences réglementaires.

Le point de départ peut être l'identification des facteurs de biais (causes d'erreurs) en dressant une liste aussi exhaustive que possible [32], pour en évaluer l'impact sur la qualité du médicament, ainsi que les données qui influencent les décisions impliquant son efficacité sur le patient et sa sécurité. [18]

Le risque est communément défini comme étant la combinaison de la probabilité d'occurrence d'un danger et la sévérité de celui-ci. [33]

Les lignes directrices de l'ICH (Q9) offrent une approche de la gestion du risque [33]. Plusieurs outils d'évaluation y sont détaillés, et peuvent être déployés en fonction des situations, des événements et des objectifs comme celui de l'amélioration continue. Les techniques les plus simples concernent l'organisation des données :

- Les logigrammes
- Les fiches de contrôles
- Les cartographies des procédés
- Le diagramme cause-effet, ou diagramme d'Ishikawa ou encore le diagramme des 5M : il permet à l'aide de ses 5 thèmes (moyens, méthode, milieu, matière, main d'œuvre) de structurer l'identification des principales composantes qui influencent un résultat final. [32]

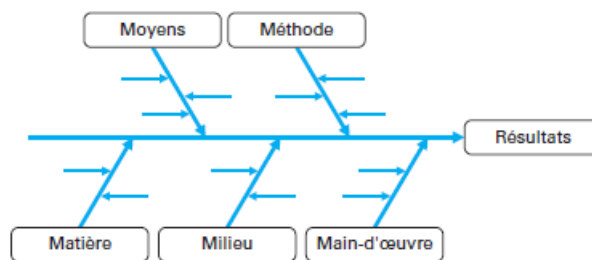


Figure n° 10 – Diagramme des 5 M

- L'AMDEC (Analyse des modes de défaillances, de leurs effets et leur criticité) permet d'établir les risques d'un processus et d'en quantifier l'impact sur la performance. Elle doit se baser sur la bonne compréhension du processus, et chaque risque doit être évalué par degrés de **gravité**, de **fréquence** et de **défectabilité**.

Chacun de ces trois indices est évalué sur une échelle de 10, dont le produit permet de calculer la criticité et ainsi de hiérarchiser les risques de manière quantitative.

L'AMDEC permet également de mesurer l'efficacité des mesures implémentées de minimisation de risques en réévaluant le degré de fréquence et de détectabilité une seconde fois.

Dans tous les cas, tous ces outils servent à évaluer des risques dans le but de les réduire à un niveau acceptable, comme l'explique la figure suivante.

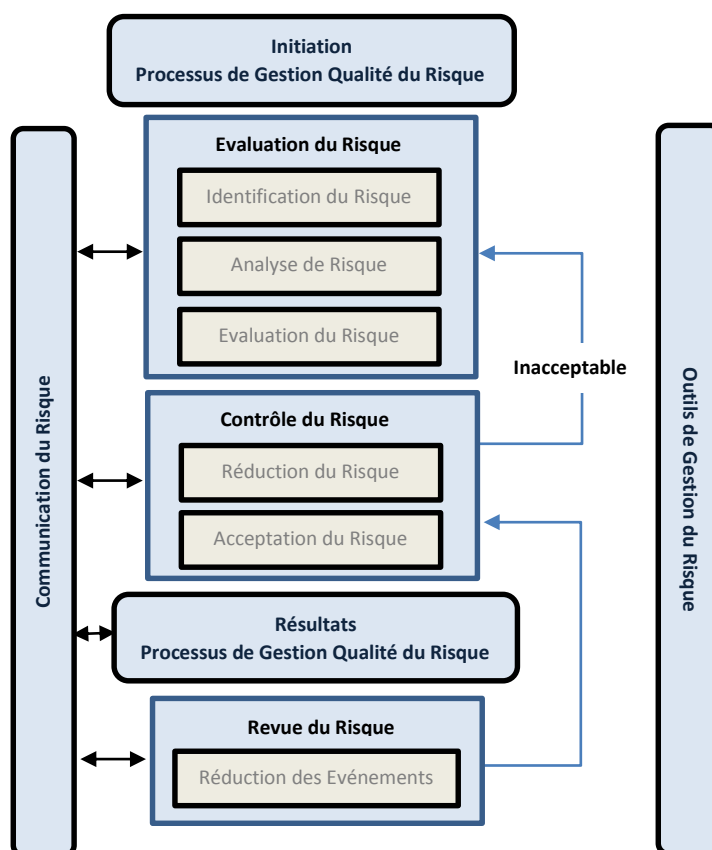


Figure n° 11 – Schématisation typique du management de risques (d'après l'ICH Q9)

Selon Barber, la validation de méthode peut également être un outil de gestion de risque. [18]

En plus d'identifier les composantes pouvant potentiellement fausser le résultat d'une méthode, il est important de les hiérarchiser pour mettre en évidence ceux qui peuvent présenter un impact plus important, afin d'orienter vers celles-ci les efforts de validation.

L'idée est qu'un risque peut être réduit à un niveau très faible, et que la validation sert à démontrer son élimination.

Cependant, des erreurs peuvent se produire durant les tests de validation eux-mêmes : l'analyste peut dévier par erreur des protocoles de validation établis et générer par exemple des données fausses ou ne pas en générer du tout. Il doit alors détecter ces erreurs, les corriger et évaluer leur impact sur la validation, ou alors ne pas les exploiter si nécessaire.

2.3.3 Cycle de vie d'une méthode

Il convient de préciser à quel moment la validation doit intervenir dans le **cycle de vie** d'une méthode. Celui-ci est décrit plus ou moins différemment selon les sources bibliographiques, on peut retenir les six principales étapes suivantes : [18] [32] [34]

1. Expression des besoins de l'utilisateur et définition des objectifs de la méthode recherchée
2. Développement ou sélection d'une méthode pour répondre au besoin de l'utilisateur
3. Mise au point de la méthode et optimisation des étapes pour les adapter à la matrice et aux conditions opératoires
4. Gestion du risque pour mettre en évidence d'éventuels risques d'erreurs et interférences avec le résultat de la méthode, dans l'objectif de leur minimisation à un niveau acceptable
5. Validation de méthode qui ne doit intervenir que sur une méthode complètement mise au point et préalablement évaluée
6. Utilisation en routine
7. Evaluations périodiques et revalidation si nécessaire, en cas d'importantes modifications

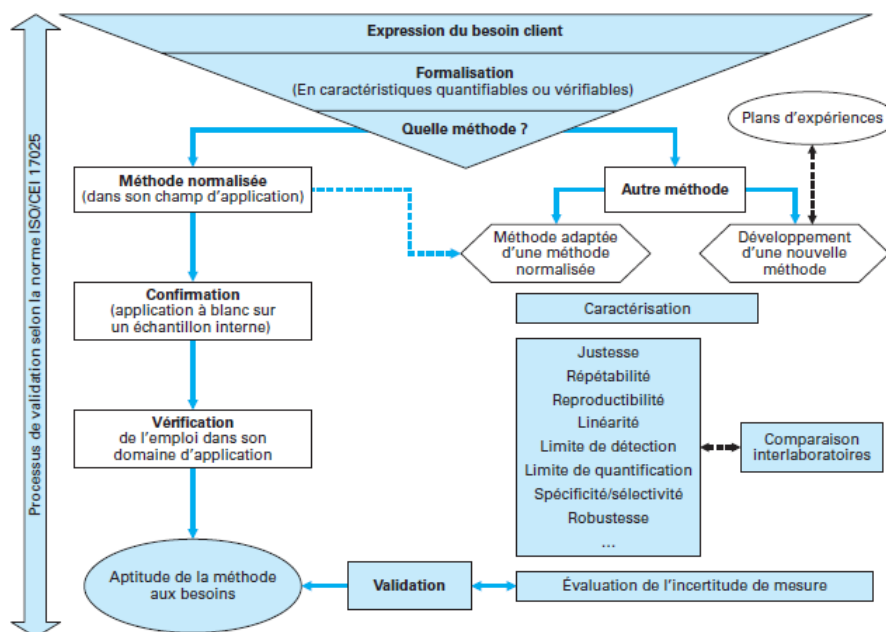
2.3.4 Validation de méthode

La validation de méthode est définie par la norme ISO 17025 qui permet l'accréditation d'un laboratoire à réaliser des analyses [35]:

La validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences en vue d'une utilisation prévue déterminées sont remplies.

Chaque méthode doit alors disposer d'un dossier de validation apportant les preuves de sa fiabilité à remplir les prescriptions particulières en adéquation avec les besoins. [18]

La norme ISO 17025 détaille le processus de validation d'une méthode dans les grandes lignes en laissant le choix à l'analyste des outils et de la méthodologie. [35]



**Figure n° 12 – Processus de validation d'une méthode (Norme ISO 17025)
(d'après Amarouche)**

Les lignes directrices de l'ICH Q2 intitulées « *Validation of Analytical Procedures : text and methodology* » [36] (Procédures analytique de validation : texte et méthodologie) apportent plus de précisions, en définissant les critères de validation classiques qui peuvent être utilisés même en dehors du domaine pharmaceutique. Par souci de cohérence avec les nombreuses sources traitant de ce sujet, le tableau suivant les résume en utilisant les termes en français et en anglais : [28]

Tableau V - Critères classiques utilisés dans la validation de méthode

Critères		Brève description	
En anglais	En français		
<i>Accuracy</i> ¹ (<i>trueness</i>)	Exactitude (ou justesse)	Proximité entre les résultats expérimentaux et la valeur réelle ou valeur de référence	
<i>Repeatability</i>	Fidélité	Répétabilité	Proximité des résultats expérimentaux d'une série de mesures, obtenus dans les mêmes conditions opératoires durant une courte période
<i>Intermediate Precision</i>		Précision Intermédiaire	Proximité des résultats expérimentaux d'une série de mesures, obtenus en incluant des variations intra-laboratoire : jour, analyses, équipements différents... etc.
<i>Reproducibility</i>		Reproductibilité	Proximité des résultats expérimentaux entre plusieurs laboratoires (appliquée lors de standardisation de méthodes)
<i>Linearity</i>	Linéarité	Capacité à obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans l'échantillon	
<i>Range</i> ²	Intervalle de validité	Intervalle entre la plus haute et la plus basse concentration de l'analyte pour lequel on peut démontrer un bon niveau de fidélité, exactitude et linéarité	
<i>Specificity</i>	Spécificité	Exprime le degré de biais et d'interférences	
<i>Limit of detection</i>	Limite de détection	Teneur la plus faible détectable	
<i>Limit of quantification</i>	Limite de quantification	Limite la plus basse pouvant être quantifiée avec fidélité et exactitude.	
<i>Robustness</i>	Robustesse	Capacité à rester inchangée malgré de faibles variations des paramètres de la méthode	

¹ son estimation implique que l'on soit capable de définir une valeur de référence, et nécessite l'emploi de matériaux ou standard de références pour l'obtention d'une valeur de référence. Ce point sera développé dans la suite de ce rapport. [34]

² Barber rappelle qu'il n'est pas nécessaire de valider au-delà de la gamme d'utilisation (limites de conformité d'un médicament). [18]

2.3.4.1 Standard de référence

L'ICH Q6(A) définit le standard de référence de manière générale : [39]

[...] un matériau ou une substance préparée pour une utilisation en tant que standard dans un test, identification, ou test de pureté. Il doit avoir la qualité appropriée à l'utilisation envisagée, pour laquelle il est souvent caractérisé et évalué par des procédures additionnelles autre que celles utilisées en routine. »

Dans le contexte de la mesure de particules, le NIST, fournisseur de standards calibrés certifiés, publie sur son site un grand nombre de standards de différentes natures physico-chimiques :

- sphères de polystyrène
- précipités de fluorure de calcium
- particules de verre ...etc.

Dans la présentation de son représentant lors du séminaire de l'USP en 2010, le Dr Ripple, cite quelques propriétés communément souhaitées dont :

- la structure irrégulière
- l'aspect variable (de sphérique à longitudinal)
- ainsi que la simplicité d'utilisation

Selon Feinberg, il existe différentes stratégies de détermination de la valeur de référence, par l'utilisation de plusieurs types de standards, tel que : [34]

- Les matériaux certifiés : la solution la mieux connue et la plus simple, car ils sont vendus accompagnés d'une valeur de référence par un organisme spécialisé (comme le NIST)

- Les matériaux de référence internes : dont la valeur de référence est assignée par l'utilisateur, et le prix est bon marché.

2.3.4.2 Valider ou ne pas valider ?

L'obligation de valider selon la norme ISO 17025 est accompagnée d'une grande latitude dans le choix de la méthodologie, laissé à la charge de l'analyste. Cette flexibilité semble refléter la nécessité de définir des protocoles de validation spécifiques aux besoins de l'utilisateur, aux objectifs de la méthode et au produit pharmaceutique contrôlé.

Selon Barber [18], la décision de ne pas valider indique que les données générées par la méthode ne sont pas impliqués dans la sécurité ou l'efficacité du médicament.

Dans le cas contraire, les méthodes servant à évaluer les attributs de qualité d'un médicament sont donc :

- Validées lorsqu'il s'agit de méthodes développées ou adaptées de normes et références.
- Vérifiées pour assurer leur adéquation avec les conditions de test du laboratoire [37] car considérées comme validées par les organismes d'accréditation [38].

2.3.4.3 Validation de méthodes physiques

Toutefois, l'ICH [36] ajoute que d'autres méthodes comme la détermination de taille des particules ne sont pas directement concernées par ses lignes directrices. En effet, comme nous l'avons précédemment vu, la détermination de taille des particules est une méthode physique.

Carlton [30] va jusqu'à dire que le terme **validation** n'est approprié que dans le cas de mesures de paramètres chimiques, et qu'il est plus judicieux de parler d'**analyse d'erreur** pour le dénombrement et la détermination de taille des particules. Selon lui, ces méthodes physiques induisent automatiquement des erreurs, principalement au niveau de la justesse et de la fidélité des résultats:

1. Les erreurs de **justesse** peuvent être liées à la préparation d'échantillon. En effet, les erreurs inhérentes à la préparation de l'échantillon peuvent impacter aléatoirement les résultats.

L'estimation de la justesse est établie par la comparaison de résultats répétés d'un seul et même échantillon exprimés par la méthode et contenus dans la gamme d'utilisation du produit, et la valeur de référence. [36]

On peut calculer le taux de recouvrement, à savoir « le pourcentage de la quantité de l'analyte obtenue par la méthode par rapport à la quantité d'analyte réellement présente » [34]

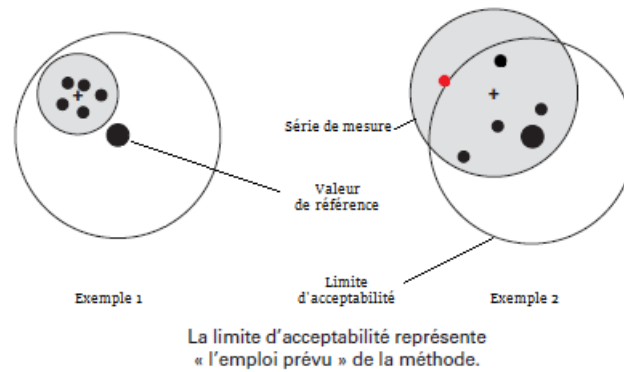
2. Les erreurs de **fidélité** peuvent être générées par le choix des paramètres d'analyse.

La fidélité peut être étudiée sur les deux niveaux intra-laboratoires :

D'abord la répétabilité : elle peut être étudiée sur des échantillons (authentiques ou artificiellement préparés). Son évaluation est réalisée sous les mêmes conditions opératoires dans un court laps de temps pour évaluer la proximité des résultats d'une série d'au moins 6 mesures, dont la dispersion peut être appréciée par l'écart-type relatif ou Coefficient de Variation (CV). [36]

La précision intermédiaire dépend des circonstances d'utilisation prévues et s'établit par l'étude des variations typiques telles que les analystes, les jours, et les équipements. La dispersion des résultats obtenus est également appréciée par le calcul du CV.

La validation d'une méthode physique doit donc se concentrer sur les critères de justesse et fidélité. Cependant, l'éclatement des objectifs, critère par critères, peut nuire à la clarté de l'enjeu selon Feinberg [34]. Par exemple, l'analyste peut être amené à accepter des résultats qui s'éloignent de la valeur de référence, mais qui sont fidèles, comme dans l'exemple 2 de la figure.



**Figure n° 13 – Concept de base de la validation :
valeur de référence et limite d'acceptabilité (d'après Feinberg)**

Feinberg (2013) [34] propose une méthodologie globale de validation dénommée **le profil d'exactitude**, qui combine les 2 critères de justesse et de fidélité, et qui permet de caractériser un résultat de manière globale, pour fournir des garanties que chaque résultat obtenu en routine sera suffisamment proche de la valeur réelle (ou de référence).

Selon lui, il faut fixer un objectif global de performance relatif à l'exactitude de la méthode et non des objectifs séparés. Les critères autres que la justesse et fidélité peuvent donc être étudiés s'ils sont applicables, en fonction des méthodes candidates à la validation, mais doivent être cohérents avec l'exactitude.

2.3.4.4 Etapes de la validation

De manière générale, la conduite d'une validation de méthode est réalisée selon les étapes clefs suivantes :

1. Définition des objectifs de performances de la méthode qui dépend du besoin formulé. [32]
2. L'exécution des tests de validation : le but ici est de planifier des expériences pour étudier chacun des critères dans le respect d'un objectif global, et de décrire, étape par étape, les procédures à exécuter et leurs critères d'acceptations. [18]
3. Vérifier l'exactitude des résultats (profil d'exactitude).
4. Documenter les résultats dans rapports de validation.

D'autres étapes de la validation s'inscrivent dans le cycle de vie d'une méthode mais à un autre niveau et sortent du cadre de ce travail : tel que la qualification des équipements associés, la maintenance et la maîtrise des changements ainsi que les évaluations périodiques.

En résumé, la validation a pour but de garantir un haut degré d'assurance de la fiabilité d'une méthode, elle n'a pas pour objectif le risque zéro. Le piège à éviter selon Barber [18] est la réalisation d'un nombre excessif de tests et de documentations qui n'augmentent pas la valeur ajoutée du produit pharmaceutique.

Le plan de validation doit donc suivre une approche rationnelle telle que les erreurs d'un système puissent être détectées et évitées à un niveau raisonnable.

Titre 3

Matériel et méthode

3. Matériel et méthode

3.1 Objectifs généraux

L'objectif général de ce travail est la validation de la méthode de comptage des particules non-visibles par microscopie dans les poches pour perfusion vides.

Avant d'entamer directement les tests de validation, il est important de comprendre la conception des poches, ainsi que leur mode d'utilisation au lit du patient afin d'appréhender au mieux l'impact de ce produit médicamenteux sur la santé et la sécurité du patient.

La contamination particulière des poches vides étant le principal sujet de cette thèse, nous détaillerons le procédé de fabrication de ces dernières et les méthodes d'analyse utilisées afin de mettre en évidence l'origine de leur contamination primaire (lors de la fabrication) ou secondaire (lors de l'analyse).

Par la suite, le travail de validation de la méthode de dénombrement sera organisé en trois temps :

- 1) D'abord la compréhension des paramètres de la méthode de test permet d'en évaluer l'impact sur les résultats au moyen d'une analyse de risque.
- 2) Ensuite, son optimisation moyennant deux approches :
 - Des recommandations d'amélioration continue afin de réduire les risques d'erreur.
 - Des essais d'optimisation de méthode afin de maîtriser l'impact des paramètres de la méthode sur les résultats.
- 3) Enfin, la méthode est validée en prouvant sa fiabilité et son adéquation avec l'objectif principal, qui est le dénombrement des particules non-visibles dans les poches pour perfusion.

3.2 Description des poches

Le laboratoire B.Braun fabrique des poches pour perfusion en plastique. Le film plastique servant à la fabrication des poches souples est constitué de deux fines couches :

- la première en polypropylène (en contact direct avec la solution de perfusion)
- la seconde en polyamide (couche externe), assurant la résistance mécanique de la poche

Ces deux couches sont liées par une strate adhésive composée de polypropylène greffé. Il est à noter que, vu la composition du film, on peut s'attendre à ce que les particules ayant pour origine le film en polyoléfine ou d'autres polymères de synthèse, soient de nature essentiellement hydrophobes.

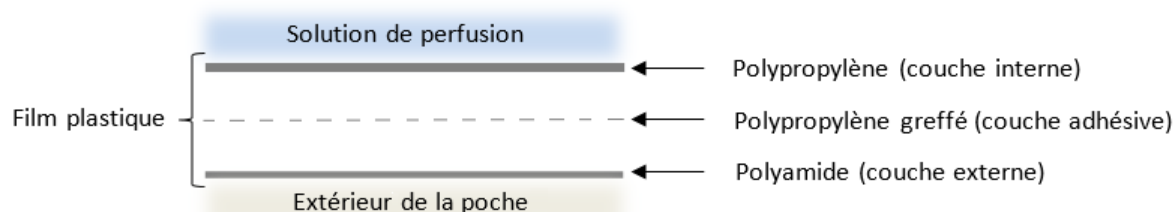


Figure n° 15 – Schéma de la composition du film plastique des poches souples

Les poches produites peuvent comporter un nombre de compartiments variant de deux à trois, et avoir un volume nominal allant de 625 à 2500 ml. L'intérêt des poches multi-compartimentées est de séparer, au sein d'un même produit pharmaceutique, des composants incompatibles entre eux sur une longue durée ou au cours de certaines étapes de fabrication telle que la stérilisation.

Par exemple, une poche pour perfusion à 3 compartiments se présente comme illustré ci-dessous. Elle inclut 4 systèmes de fermeture :

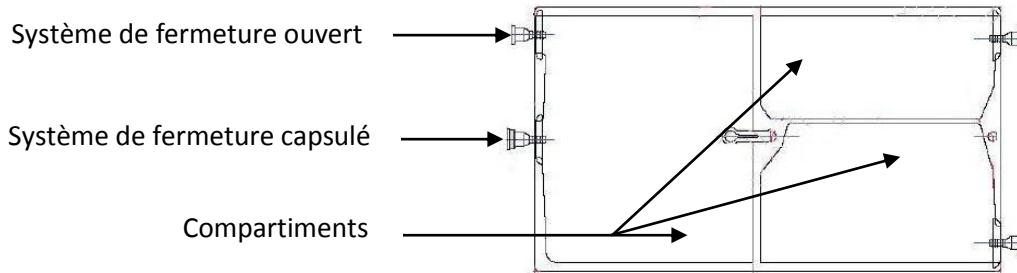


Figure n° 16 – Illustration du design d'une poche pour perfusion à trois compartiments

- 1 système de fermeture capsulé d'origine
- 3 systèmes de fermeture ouverts. Ils seront capsulés après remplissage par les solutions de perfusion

3.3 Production des poches

Tout processus de mise en forme pharmaceutique produit inévitablement des particules, et afin de comprendre l'origine des particules qui peuvent potentiellement contaminer les poches pour perfusion, il est important de détailler leur procédé de production, qui inclut deux étapes : le formage et l'insertion des systèmes de fermeture.

3.3.1 Formage des poches

Préalablement, les matières premières (bobines de film en plastique et systèmes de fermetures) sont déconditionnées dans un SAS matériel, à l'entrée de la ZAC (Zone à Atmosphère Contrôlée). Ensuite, les bobines de film sont installées sur les machines de formage, en vue d'y être déroulées, imprimées, soudées et découpées :

- Dès que le film est déroulé, les données réglementaires y sont imprimées, incluant entre autres le nom du médicament, le N° d'AMM et la composition
- Le film imprimé avance progressivement vers l'appareillage de soudure qui forme les parois des poches, puis vers un couteau en céramique dont le rôle est la découpe longitudinale de la lisière des poches soudées. Un aspirateur est localisé à ce niveau du procédé pour éliminer les particules générées par le système de découpe
- Un couteau-navette assure la découpe transversale des poches
- A l'issue de cette première étape de fabrication, les produits semi-finis sont soumis à des tests physiques au niveau d'un premier poste de contrôle IPC

3.3.2 Insertion des systèmes de fermeture

Les systèmes de fermeture sont placés dans des bols vibrants, qui les font avancer individuellement par un mouvement saccadé dans l'objectif d'éliminer d'éventuelles particules collées. Après une phase de préchauffe, les systèmes de fermeture sont insérés dans les poches formées, par le bras de convoyage et soudées au moyen de mors de soudure chauffants.

Un deuxième poste de contrôle IPC permet de réaliser des tests sur les poches finies, et d'effectuer l'échantillonnage statistique pour le contrôle qualité.

Les poches sont enfin emballées par trentaine dans un double sac en plastique, puis stockées dans des cartons en attendant la libération puis le transport au site de remplissage.

3.4 Mode d'utilisation au lit du patient

Dans le RCP, il est préconisé de mélanger les compartiments des poches pour perfusion juste avant l'administration au patient.

D'abord, appliquer une légère pression pour rompre les soudures pelables qui séparent les différents compartiments de la poche de perfusion : [40]



Figure n° 17 – Rupture des soudures pelables d'une poche multi-compartiments (documentation de B.Braun)

Puis, retourner les poches de perfusion et mélanger le contenu des compartiments minutieusement avant d'infuser au patient :



Figure n° 18 – Mélange du contenu d'une poche multi-compartiments (documentation de B.Braun)

Et enfin, administrer au patient :



Figure n° 19 – Préparation de la perfusion pour l'administration au patient (documentation de B.Braun)

3.5 La méthode d'analyse

De manière générale, la méthode d'analyse est établie à partir de 3 références normatives :

- la norme ISO 15747 qui décrit les tests à réaliser sur les poches vides de manière générale
- la norme ISO 8871-3 qui décrit les conditions de remplissage des poches vides pour le comptage des particules
- la Ph. Eur. (méthode 2 de la monographie 2.9.19) qui décrit les conditions de filtration de solvant, et de dénombrement au microscope ainsi que les limites d'acceptation.

Elle comporte 3 phases :

- 1) **Le remplissage** : les poches pour perfusion sont remplies au sein d'une enceinte à flux laminaire verticale à l'aide d'un solvant de remplissage exempt de particules, composé d'eau et de polysorbate 80.
- 2) **La filtration** : le solvant de remplissage est filtré sur une membrane de porosité 0.45 µm qui retient les particules initialement contenues dans les poches.
- 3) **Le dénombrement** : la membrane est observée sous microscope optique avec éclairage épiscopique (autours de l'échantillon) et oblique (par le côté).

Cette méthode de test est chronophage. En effet, l'analyse d'un échantillon dure environ 45 minutes :

Tableau VI – Durée de réalisation de l'analyse par étape d'une poche pour perfusion

Etape	Durée (minutes)
Remplissage	10
Filtration	20
Dénombrement partiel	15

Afin de réduire la durée de réalisation de l'étape de filtration (2) sous vide à moins de 10 minutes, seul un volume de 500 ml est filtré au lieu de la totalité, aboutissant à une analyse partielle. Cette analyse partielle du volume est citée seulement pour la méthode 1 de la monographie 2.9.19. Elle fera l'objet d'une évaluation lors de la validation de méthode.

Le dénombrement au microscope (3) est réalisé en deux temps :

- Dénombrement total de la membrane sans distinction de taille à un grossissement de 20 fois, réalisé à titre indicatif, exploité en cas d'investigation et à des fins statistiques (analyses de tendance).
- Dénombrement partiel (selon la Ph. Eur.) à un grossissement de 90 fois, avec distinction de taille des particules $\geq 10 \mu\text{m}$ et $\geq 25 \mu\text{m}$. Il est réalisé sur 8 fenêtres, distribuées en forme de Z de sorte qu'elles soient représentatives de la totalité de la membrane. Celles-ci sont fixes et réparties selon le schéma illustré ci-dessous, afin de permettre de standardiser l'opération.

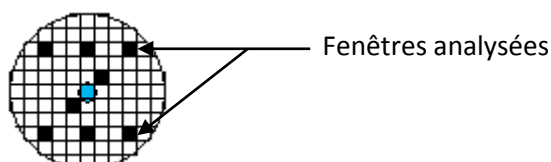


Figure n° 20 – Illustration de l'analyse partielle de la membrane de filtration

La surface des 8 fenêtres représente 1/48^{ème} de celle de la partie filtrante de la membrane. Sur celle-ci, la détermination de la contamination particulaire est réalisée par extrapolation en multipliant par 48. Puis, en divisant par le volume filtré, le résultat final est exprimé en « particule/ml ».

Le dénombrement partiel de la membrane fera également l'objet d'une évaluation lors de la validation de méthode.

La détermination de taille, n'est pas faite par comparaison à des cercles de référence tel que préconisée par la Ph. Eur., mais à l'aide d'un logiciel qui permet de déterminer la surface de chaque particule de manière précise et d'en calculer le diamètre équivalent selon la formule suivante :

$$\text{diamètre équivalent} = 2 \times \sqrt{\frac{\text{Aire de la particule mesurée}}{\pi}}$$

Ainsi, on obtient les diamètres à partir des surfaces, comme suit :

Tableau VII – Correspondances entre surface et diamètre équivalent d'une particule

Surface	Diamètre équivalent
$\geq 78.5 \mu\text{m}^2$	$\geq 10 \mu\text{m}$
$\geq 491 \mu\text{m}^2$	$\geq 25 \mu\text{m}$





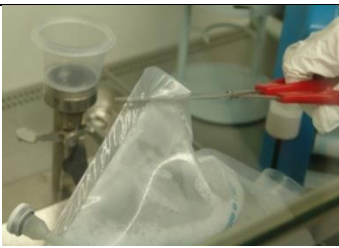






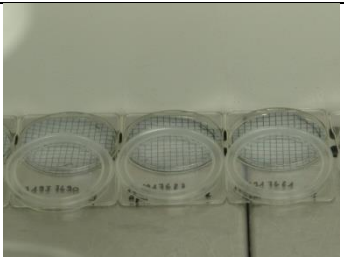
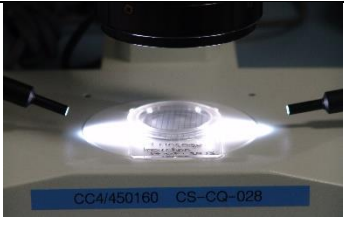
Figure n° 21 – Enceinte à flux laminaire prête pour une session de travail

Notons que l'enceinte à flux laminaire est sujette à des procédures de nettoyage périodique qui permettent d'augmenter l'efficacité du flux laminaire. De ce fait, sa contribution à la contamination particulaire est jugée négligeable.

3.5.1 Etapes de la méthode

Tableau VIII – Description détaillée de la méthode d'analyse des poches pour perfusion

Etape	Image	Description
Remplissage		Remplissage des poches par l'eau ROW, à travers un système de filtration de porosité de 0.2 µm dont le rôle est de la rendre exempte de particules
Addition de Polysorbate 80		Ajout de polysorbate 80 à l'aide d'une seringue munie d'un filtre de porosité de 0.2 µm dont le rôle est de le rendre exempt de particules
Bouchage		Bouchage des ports avec une colle à séchage rapide
Rupture des soudures pelables		Pression manuelle sur les poches pour casser les soudures pelables, suivie d'une étape de mélange. A noter que les potentiels reliquats des soudures peuvent empêcher la circulation des particules entre les compartiments et vers l'extérieur de la poche lors de l'étape suivante de filtration.
Ouverture des poches		Découpage d'une portion de la poche avec une paire de ciseaux

Rinçage du matériel		Rinçage à l'eau ROW exempte de particules du filtre à 0.45 µm de porosité et d'un entonnoir
Placer le filtre		Le filtre à 0.45 µm est placé sur le dispositif de filtration
Placer l'entonnoir		L'entonnoir est placé sur le dispositif de filtration
Filtration		<p>Filtration du solvant, totale ou partielle, selon l'échantillon à analyser.</p> <p>Exemple : pour les poches de 2500 ml à 3 compartiments, le volume filtré correspond à 500 ml.</p> <p>La filtration partielle sera évaluée lors de la validation.</p>
Séchage des filtres		<p>Les filtres sont placés dans des boîtes transparentes avec un couvercle entrouvert, dans l'enceinte à flux laminaire.</p> <p>Cette étape est décrite dans la Ph. Eur.</p>
Comptage des particules		Dénombrement des particules au microscope

Solvant avec contamination
particulaire inhérente

Solvant rendu exempt de
particule par filtration à
travers des pores de $0.2 \mu\text{m}$

Mise en suspension des
particules contenues dans la
poche

Rétention des particules
extraites par la membrane
(rétentat) $0.45 \mu\text{m}$ filtre le
solvant (filtrat)

Dénombrement des particules
par microscopie

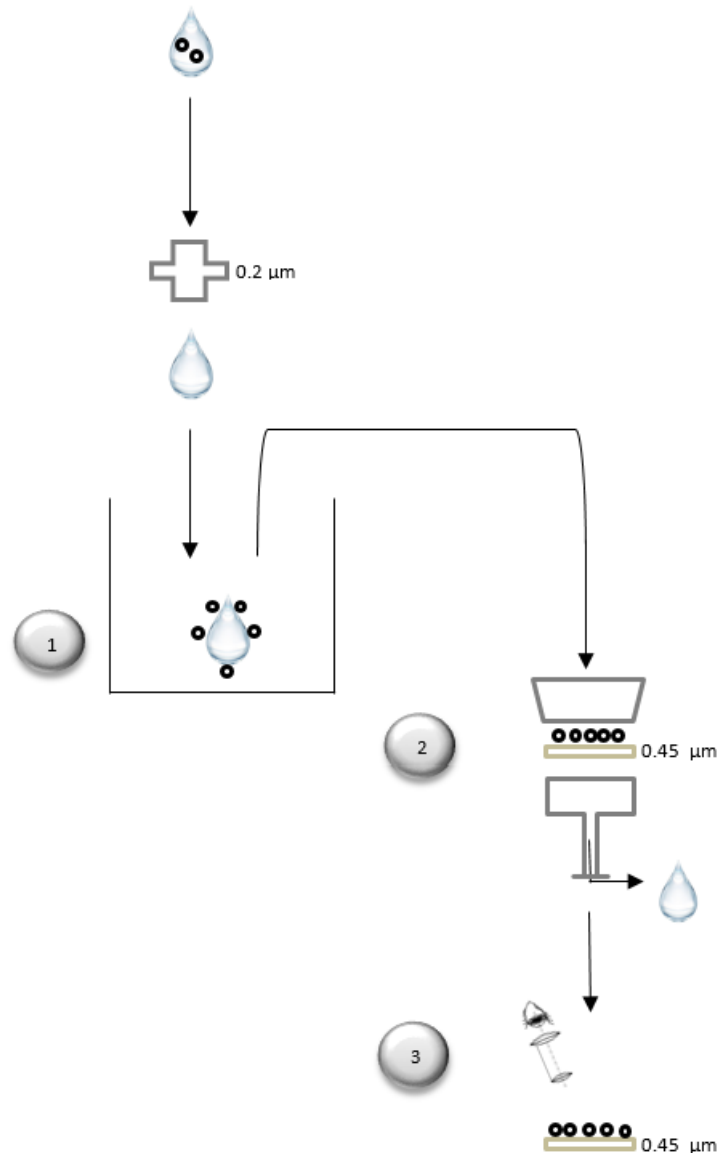


Figure n° 22 – Schéma simplifié de la méthode de comptage des particules dans les poches

Dans le cadre de ce travail « la mise en suspension » est employée pour décrire le phénomène qui se

produit à l'étape **1**. En effet, lorsqu'une entité physique rencontre un solvant, elle est susceptible d'adopter l'un ou l'autre des deux comportements :

1. Mise en solution : la particule est dissoute par le solvant à l'état moléculaire et n'est plus distinguée de celui-ci. Dans ce cas-là, elle ne répond plus à la définition de la particule, telle que donnée par la Ph. Eur.
2. Mise en suspension : la particule est emportée par le solvant, sans y être dissoute. Elle reste distinguable soit à l'œil nu (particule visible) ou non (particules non-visible). Ceci aboutit à former une suspension composée du solvant de remplissage et des particules contenues dans la poche.

La « mise en suspension » semble le plus adéquat pour décrire ce phénomène.

2

L'étape apparaît comme une étape cruciale dans la préparation de l'échantillon pour l'analyse. En effet, le solvant peut ne pas entraîner toutes les particules contenues dans la poche, sans possibilité à ce niveau-là de détecter le nombre de particules restées dans la poche.

Il est, de ce fait, impératif d'évaluer le taux d'extraction des particules par le solvant, dans la suite de ce rapport.

Aussi, on parle d'extraction des particules. De nouveau, est-ce le terme adéquat ?

L'extraction désigne généralement un procédé de séparation physico-chimique, qui n'est pas l'objet de ce travail. Dans le cadre de celui-ci, l'extraction vient du verbe *extraire*, qui désigne l'action d'ôter ou de retirer un objet du lieu où il se trouve.

3

A l'étape , l'analyste compte les particules retenues sur la membrane de 0.45 µm.

3.5.2 Les particules analysées

Les particules analysées en routine présentent un aspect blanchâtre, et sont de tailles variables, comme on peut le constater sur la figure ci-dessous.

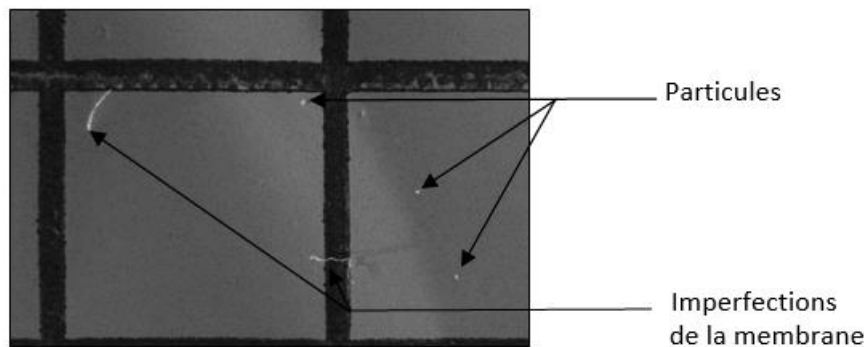


Figure n° 23 – Photographie sous microscope de membrane après filtration de solution (Grossissement à 90 fois)

Du fait de la multiplicité des origines possibles des particules analysées en routine, on considère que leur nature physico-chimique peut être multiple, bien qu'homogène dans le temps.

3.6 Analyse de risque

Au microscope, les particules comptabilisées devraient refléter la contamination particulaire des poches, mais cela dépend de trois facteurs principaux :

- L'aptitude de l'analyste à distinguer les particules au microscope optique
- Le taux d'extraction des particules par le solvant
- La contamination secondaire lors de la préparation de l'échantillon

L'objectif de cette analyse de risque est d'évaluer leur impact sur le nombre des particules.

1. Le facteur humain :

L'évaluation de la présence d'une particule ou non se trouve soumise à la subjectivité humaine. En effet, l'analyste peut, en cas de fatigue oculaire, omettre de compter un certain nombre de particules, en les considérant par exemple comme des imperfections de la membrane.

Dans le cas d'un nombre élevé de particules, leur distinction en devient difficile si elles sont trop proches ou superposées.

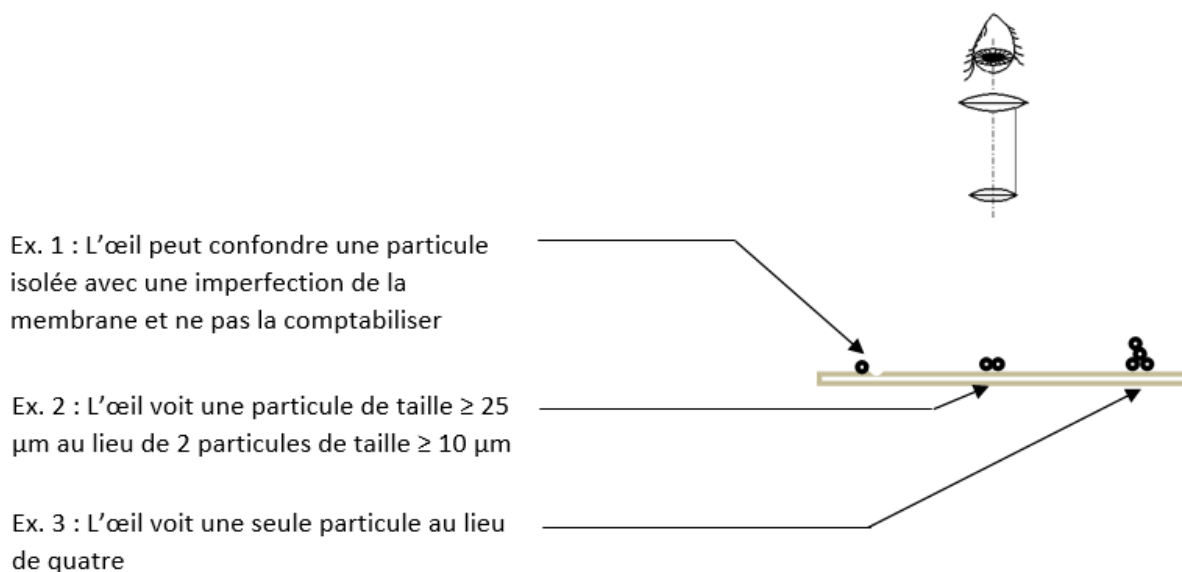


Figure n° 24 – Illustration du risque d'erreur inhérent au facteur humain

Dans les premier et dernier exemples, ce facteur agit en faveur d'une sous-évaluation du résultat. A contrario, dans le 2e exemple, il agit en faveur d'une surévaluation.

2. Le taux d'extraction des particules par le solvant :

Si le solvant n'a pas la capacité d'emporter toutes les particules, cela entraîne une sous-évaluation du résultat. Ce point sera repris dans l'optimisation de la méthode.

Le design de certaines poches pour perfusion peut présenter des caractéristiques en faveur de ce phénomène :

- la grande surface du film, sur lequel les particules hydrophobes peuvent rester accrochées
- le nombre élevé de compartiments dont les reliquats des séparations peuvent subsister après cassure des soudures pelables, et empêcher la libre circulation des particules vers l'extérieur.

Le *worst case* serait donc les poches pour perfusion de 2500 ml à 3 compartiments.







3. La contamination secondaire lors de la préparation d'échantillon :

La maîtrise des particules non visibles dans l'environnement d'analyse présente des limites : la méthode de test peut comporter des étapes critiques pouvant favoriser une augmentation des particules durant la préparation de l'échantillon jusqu'à l'analyse (ou contamination secondaire) à deux niveaux possibles :

- Les poches : échantillons analysés
- Les membranes de filtration, servant au dénombrement sous microscope

Afin de mettre en évidence les étapes à l'origine du risque de contamination secondaire, le tableau descriptif de la méthode de test est repris :

Tableau IX – Evaluation du risque de contamination sur les principales étapes de la méthode de test

Etape	Evaluation du risque de contamination secondaire	Image
Remplissage	<ul style="list-style-type: none"> - Présence de particules en aval du filtre - Contamination des poches via le système d'ouverture pendant le remplissage 	
Bouchage	<ul style="list-style-type: none"> - Relargage de particules par la colle qui est en contact avec le solvant de remplissage 	
Rupture des soudures pelables	<ul style="list-style-type: none"> - Génération de particules lors de l'opération 	
Ouverture des poches	<ul style="list-style-type: none"> - Génération de particules lors du découpage du film 	
Filtration	<ul style="list-style-type: none"> - Exposition du solvant à l'environnement 	
Séchage des filtres	<ul style="list-style-type: none"> - Contamination secondaire des filtres par l'environnement 	

De manière générale, on peut citer le risque lié au facteur humain à toutes les étapes. Le nombre élevé de manipulations, longues et répétitives sur un seul échantillon, accroît le risque d'erreur avec ce qui est nommé la « contamination en amont ».

Ce phénomène survient à chaque fois que l'opérateur met un objet (par exemple sa main) entre la source d'air propre (surface supérieure de la hotte à flux laminaire verticale) et l'échantillon manipulé : les particules sont transportées par voie aérienne et véhiculées par le flux laminaire lui-même vers l'échantillon.

La contamination des membranes filtrantes pendant l'étape de séchage peut être détectable. En effet, il se forme dans ce cas un nuage de particules en forme de croissant correspondant à la partie du filtre exposé à l'environnement, en raison de la position entrouverte du couvercle de la boîte de Pétri.

Dans l'image ci-dessous, on peut observer que la contamination secondaire au sein de l'enceinte à flux laminaire est causée par des particules de taille très fine :

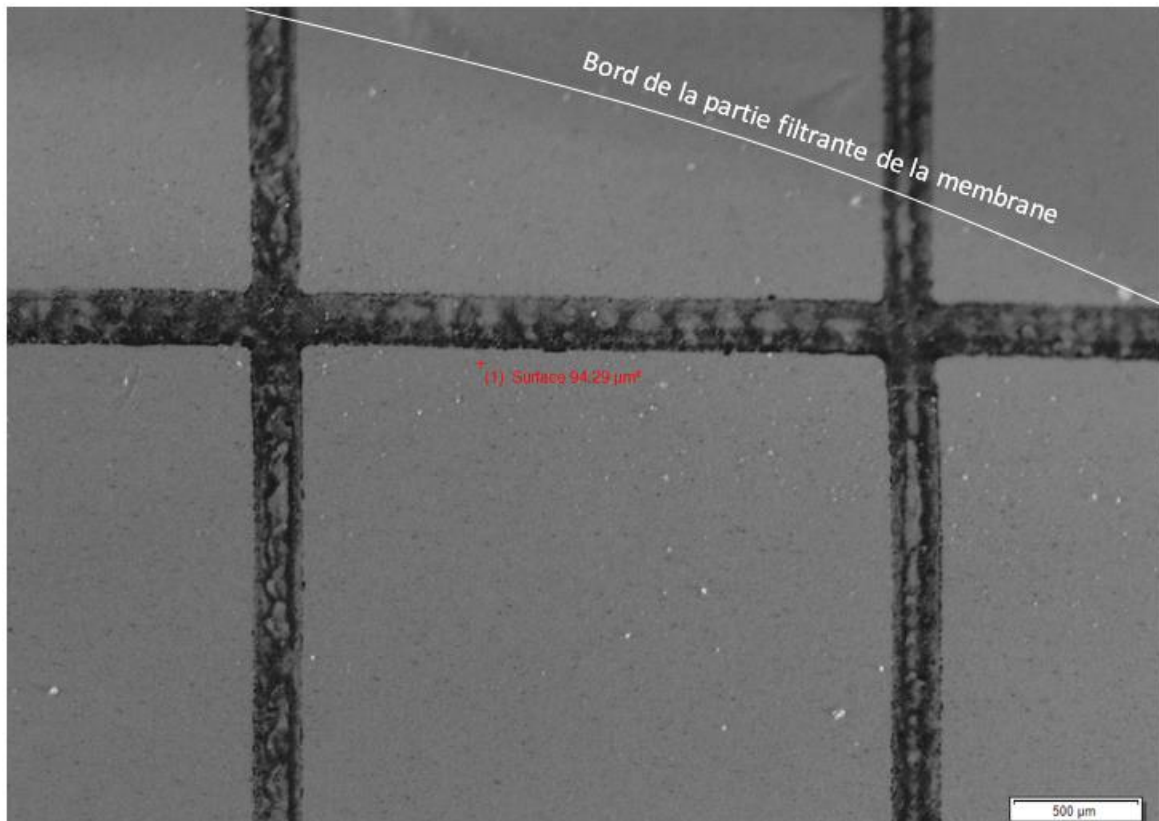


Figure n° 25 – Photo d'un filtre présentant une probable contamination pendant l'étape de séchage (Grossissement à 90 fois)

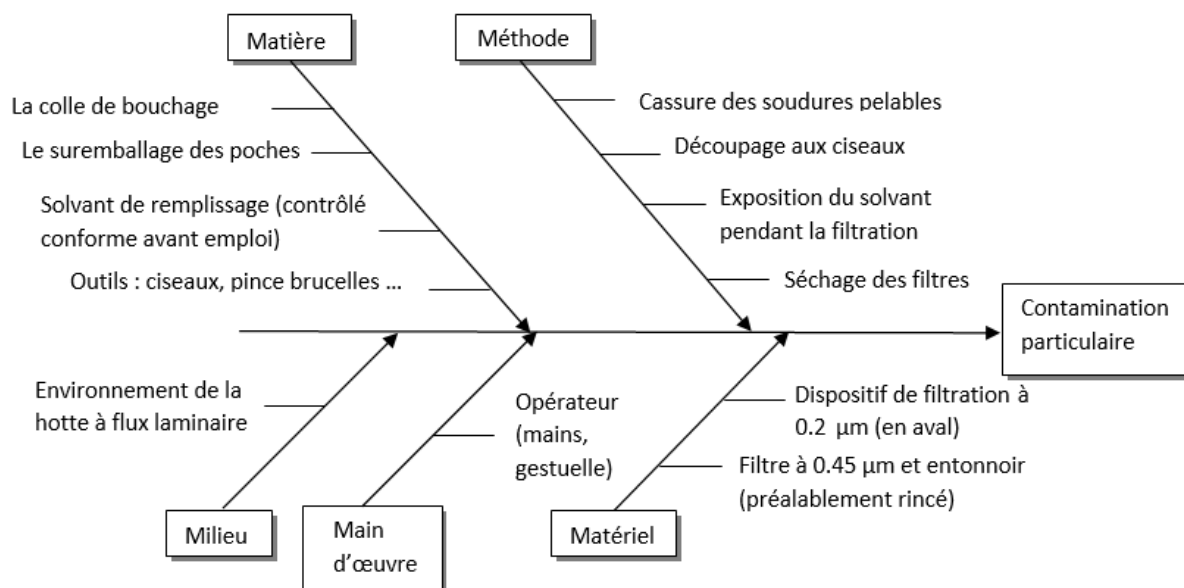


Figure n° 26 – Diagramme d'Ishikawa représentant les principales sources de contamination secondaire

De manière générale, les 3 facteurs de biais dans cette méthode de test peuvent être classés comme suit:

Tableau X – Facteurs de biais de surévaluation et sous-évaluation

Facteur de biais	Impact sur les résultats	
	Surévaluation	Sous-évaluation
Facteur humain	x	x
Taux d'extraction des particules par le solvant de remplissage		x
Contamination secondaire	x	

Les résultats peuvent donc être surévalués ou sous-évalués.

La sous-évaluation (faux négatif) apparaît comme étant plus grave que la surévaluation : en effet, il est plus dangereux d'annoncer une contamination particulaire en apparence basse et conforme, alors que la valeur réelle pourrait être plus élevée voire même non-conforme, menant à un potentiel effet néfaste sur le patient.

La surévaluation (faux positif) peut mener le fabricant à rejeter un lot qui serait en réalité conforme, et engendrer une perte de nature financière, mais ne représente aucun risque pour le patient.

Dans un cas comme dans un autre, il est important de générer des données correctes, avec un résultat représentatif de l'état effectif de contamination particulaire des produits médicamenteux.

Notons que l'outil AMDEC ne pouvait être utilisé dans le cas de cette méthode, car il est difficile d'évaluer objectivement la fréquence et la détectabilité des étapes et des facteurs de risques. Dans l'exemple de la contamination secondaire des filtres par l'environnement (dernière étape du tableau IX), bien que la figure n° 25 décrive un mode de détection de ce type de contamination, il n'est nullement discriminant : un croissant de fines particules peut se former sur le bord de la membrane filtrante dans d'autres situations. La fréquence est également difficile à évaluer, ce type de contamination peut se produire à chaque étape.

Par conséquent, la criticité de ces éléments n'a pu être quantifiée.

3.7 Optimisation de la méthode

3.7.1 Recommandation d'amélioration continue

Basé sur l'analyse de risque, des recommandations d'amélioration continue sont proposées afin de réduire à son plus bas niveau les risques d'erreur, dont principalement :

- Les bonnes pratiques de gestuelles au sein d'une enceinte à flux laminaire vertical afin de réduire les erreurs humaines par ce que l'on appelle « la contamination en amont » : la manière correcte d'opérer implique de déplacer les objets à l'aide d'un mouvement parallèle au plan de travail, et donc perpendiculaire au flux laminaire, sans jamais passer par-dessus l'échantillon pour ne pas l'exposer aux contaminants.
- Le bon positionnement dans l'enceinte des filtres en cours de séchage : plus ils sont éloignés des manipulations en cours (vers le fond de l'enceinte par exemple), plus on réduit le risque de contamination secondaire par les particules générées par l'analyste.
- Le rinçage interne et externe du dispositif de filtration en aval du filtre (voir image ci-dessous) afin de ne pas contaminer l'eau rendue exempte de particules à l'aide du filtre de porosité 0.2 μm .

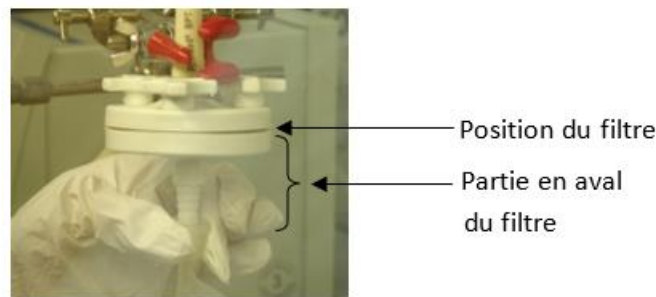


Figure n° 27 – Illustration de l'amélioration continue au niveau du filtre de porosité 0.2 μm

- La limitation du découpage de la poche sur la plus petite portion possible (figure n° 28). Plus la partie découpée est petite, plus le nombre de particules potentiellement générées est réduit. Par ailleurs, un outil de découpe propre et bien affûté réduira aussi le risque de contamination secondaire.



Figure n° 28 – Illustration de l'amélioration continue au niveau du découpage

- La variation de l'angle d'illumination des lampes rasantes permet une meilleure distinction des particules lors du comptage par microscopie, en mettant en évidence leur 3^e dimension par rapport aux imperfections de la membrane. Ce point est proposé par les techniciens du laboratoire B.Braun.

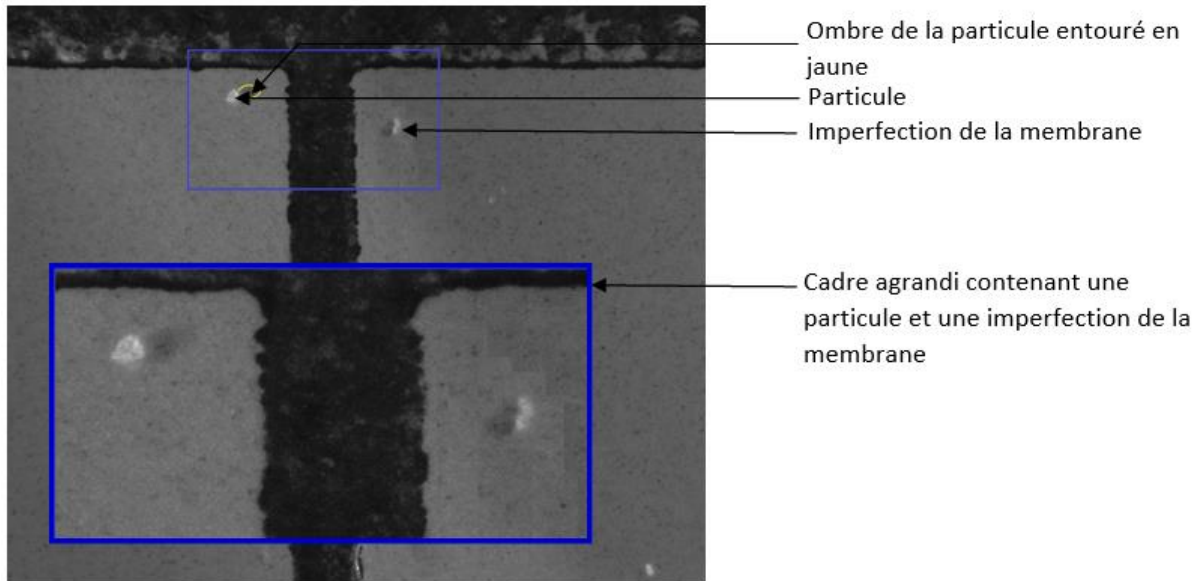


Figure n° 29 – Photographie par microscopie d'une partie de membrane contenant une particule et une imperfection (Grossissement à 90 fois)

On peut observer à gauche du cadre agrandi une particule de forme arrondie et de couleur blanchâtre. Elle présente une ombre sur sa droite, dont la taille varie en fonction de l'angle d'éclairage de la lampe, qui confère à la particule une forme tridimensionnelle.

A l'inverse, on peut observer à droite du cadre une imperfection de la membrane en forme de trou. Une partie en forme de croissant est éclairée par les lampes, alors que le creux ne l'est pas et reste à l'ombre sauf si on positionne les lampes à un angle de 90°.

Ainsi, le fait de bouger les lampes d'éclairage rend plus distinguables les formes, les tailles des particules, ainsi que les imperfections de la membrane.

De manière générale, la subjectivité humaine est un facteur non quantifiable. De ce fait, « faire de son mieux » n'est de toute évidence pas une recommandation, et la prolongation du temps d'analyse, déjà chronophage, n'est pas une solution optimale, car elle conduit à une fatigue oculaire qui nuit à la qualité des résultats.

Il est à noter que ces recommandations ont été suivies lors de tous les protocoles de tests décrits dans ce travail, en plus de la vérification des conditions du test selon la Ph. Eur.

3.7.2 Optimisation du taux d'extraction des particules

Ce travail d'optimisation de méthode a pour objectif de sélectionner le solvant de remplissage, principal paramètre influençant le taux d'extraction des particules.

Il nécessite des étapes préalables, comme nous le verrons dans les pages suivantes, et pour les besoins du présent test, nous considérons les deux classes de particules comme suit, afin de pouvoir apprécier à tout moment la proportion entre les particules de taille fine et celles de taille moins fine :

- particules $\geq 10 \mu\text{m}$ mais $< 25 \mu\text{m}$
- particules $\geq 25 \mu\text{m}$

On peut également considérer le temps et la vitesse de mélange (étape suivant le remplissage) comme des paramètres influents, mais cela laisse supposer que les particules sont difficiles à détacher pour nécessiter plus de temps de contact avec le solvant ou un mélangeage plus vigoureux. Ce type de particules n'est pas concerné par ce travail, car de toute évidence si elles étaient à ce point collées aux parois intérieures des poches pour perfusion, elles n'atteindraient jamais le patient au cours d'une perfusion ordinaire.

Par ailleurs, le taux d'extraction ou **taux de recouvrement** des particules exprime la proportion entre le nombre de particules extraites à l'aide du solvant de remplissage (valeur expérimentale) et celles contenues réellement dans la poche vide (valeur de référence), selon la formule :

$$\text{Taux de recouvrement (\%)} = \left(\frac{\text{Valeur expérimentale}}{\text{Valeur de référence}} \right) \times 100$$

Mais comment obtenir une valeur de référence ?

Pour ce faire, l'idée de départ était de rincer une poche un nombre de fois suffisant pour la rendre exempte de particule, et lui apporter par la suite une contamination artificielle préalablement connue. Cette méthodologie postule la possibilité de rendre une poche complètement exempte de particules, ainsi que la mise en œuvre de conditions opératoires permettant de prélever une quantité connue de particules sans en modifier le nombre, tel qu'un standard de particules dont le nombre et la taille sont déterminés par le fabricant du standard.



Figure n° 30 – Illustration des valeurs expérimentale et de référence

Mais quel standard choisir ? Et comment rendre une poche pour perfusion exempte de particules ? Pour répondre à la deuxième question, il est nécessaire dans un premier temps de choisir un standard de particules. Il en existe une multitude sur le marché, et ils diffèrent par la taille des particules et leur nature chimique.

Le choix tiendra compte en premier lieu de la taille :

La norme ISO 8871-3 présente 4 classes de tailles pour les particules non-visibles : $\geq 2 \mu\text{m}$, $\geq 5 \mu\text{m}$, $\geq 10 \mu\text{m}$, $\geq 25 \mu\text{m}$, alors que les critères d'acceptation normatives de la Ph. Eur. ne concernent que les deux dernières classes : $\geq 10 \mu\text{m}$, $\geq 25 \mu\text{m}$.

Les valeurs des deux premières ($\geq 2 \mu\text{m}$, $\geq 5 \mu\text{m}$) n'étant pas normés, ces classes ne sont pas prises en compte dans ce travail d'optimisation de méthode.

Afin de définir des tailles fixes, les particules employées sont de tailles égales à $10 \mu\text{m}$ et $25 \mu\text{m}$.

3.7.2.1 Standard externe de microsphères de polystyrène

Introduction :

Le choix premier s'oriente vers des billes de polystyrène calibrées de taille égale à 10 et 25 µm, conditionnées dans deux flacons séparés.

Ce choix est motivé par la facilité de se procurer ce standard très répandu, peu coûteux et utilisé pour la qualification annuelle des équipements de comptage des particules par blocage de la lumière.

Chaque flacon contient : (Annexe 3)

- 65×10⁶ particules de 10 µm
- 8.5×10⁶ particules de 25 µm

Objectif et stratégie :

Le test suivant a pour objectif d'évaluer l'utilisabilité de ce standard. La stratégie repose sur la détermination de la valeur de référence dans des conditions semblables à celles décrites dans la méthode de test, à l'aide d'un matériel rendu exempt de particules, et en incluant les principales étapes qui sont :

- Mise en suspension dans l'eau exempte de particules.
- Addition de 0.1% de polysorbate 80.
- Filtration d'un volume donné sur une membrane de porosité 0.45 µm.
- Comptage des particules par microscopie.

Une analyse par blocage de la lumière est réalisée à titre indicatif, avant l'addition du polysorbate 80.

Précautions particulières préalables :

Le matériel et la verrerie (embout de pipette et bécher) destinés à être mis en contact avec la suspension du standard sont rincés 3 fois à l'eau ROW chauffée à 80°C et additionnée de quelques gouttes de polysorbate 80, avec un traitement aux ultrasons.

Le chauffage de l'eau permet d'abaisser la viscosité du tensioactif afin de faciliter sa solubilisation. Ce dernier a pour rôle de laver le matériel, et les ultrasons servent à faire se détacher les particules collées sur les parois.

Ce traitement vise à rendre le matériel exempt de particules pour ne pas modifier la qualité du standard de particules.

Prélèvement et dilution du standard :

Pour chaque standard, un volume de 100 µl est prélevé à l'aide d'une pipette et mis en solution dans 1000 ml d'eau exempte de particules, aboutissant à 2 solutions :

Tableau XI – Prélèvement et dilution du standard

Origine/Contenant	Volume (ml)	Nombre de particules dans la solution	
		Particules de 10 µm	Particules de 25 µm
Flacon	15	65 × 10 ⁶	8.5 × 10 ⁶
Prélèvement ¹	0.1	433 333	56 667
Bécher contenant 1ml dilué au 1/1000 ^e	1	433	56

¹ Calculs en annexe 4.

Méthodes d'analyse :

a) Blocage de la lumière :

Les 2 suspensions de particules sont analysées comme suit :

- Disposer un volume suffisant (> 100 ml) dans un bécher préalablement traité
- Placer l'échantillon au centre de la cible du compteur
- Faire descendre la sonde de prélèvement à 1 cm du fond de l'échantillon
- Réaliser 4 cycles de mesures : le résultat du premier est rejeté car il sert à rincer l'appareillage de comptage, seuls les 3 suivants, automatiquement moyennés par l'appareil de mesure servent à la récolte de résultats.

b) Filtration sur membrane :

Après analyse par blocage de la lumière, chaque suspension de particule est :

- Additionnée de polysorbate 80 à une concentration de 0.1%
- Un volume de 500 ml est filtré sur membrane de porosité 0.45 µm
- Suivi du comptage par microscopie, au grossissement de 90 fois.

Résultats :

a) Blocage de la lumière :

Tableau XII – Résultat par blocage de la lumière de l'évaluation du standard externe

Standard	Résultats (particules/ml)						Moyenne (particules/ml)	Ecart-type	Valeur attendue
	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5	N°6			
10 µm	173	180	186	172	178	169	176	6.2	433
25 µm	5	7	3	4	5	5	4	1.3	56

b) Filtration sur membrane :

Non réalisable (voir discussion ci-dessous).

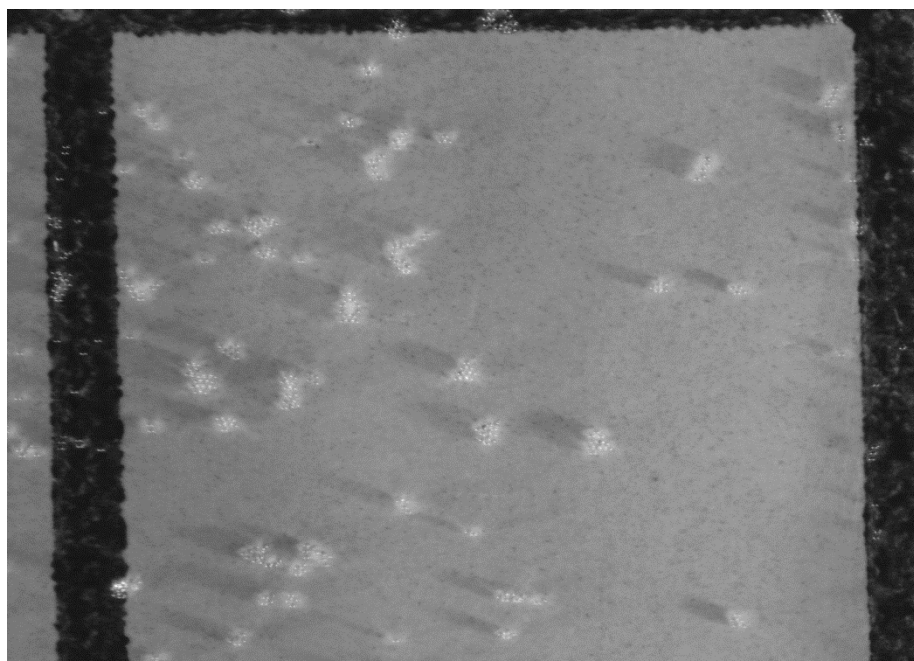


Figure n° 31 – Photographie des billes de polystyrène vue sous microscope au grossissement x90

Discussion des résultats :

a) Blocage de la lumière :

Il existe un écart considérable entre la valeur attendue et la valeur obtenue. Il ne peut s'expliquer que par un manque d'homogénéité dans l'échantillon testé.

Le polystyrène est un polymère hydrophobe de densité égale à 1.05 g/cm^3 , tandis que l'eau a une densité de 0.999 g/cm^3 .

Il est possible, par exemple, que les particules de polystyrène s'agglutinent entre elles ou sur les parois du bécher du fait de leur hydrophobie, ou précipitent au fond de celui-ci du fait de leur densité relativement plus grande.

Il est à noter qu'en pratique, les billes de polystyrène calibrées ne sont pas destinées à des manipulations telles que le pipetage, le transvasement hors du flacon original ou les dilutions. L'entreprise Skan, fournisseur des systèmes de comptage par blocage de la lumière de marque Royco, les utilise, par exemple, dans leurs conditionnements d'origine pour les qualifications annuelles de ses équipements.

Pour finir, durant le test, les échantillons de standard analysés ont été exposés à l'environnement qui a pu contribuer à en modifier la qualité, au augmentant le nombre de particules. Mais cette hypothèse n'est pas valable compte tenu des résultats plus bas que les valeurs attendues.

b) Filtration sur membrane :

Le comptage des particules par microscopie n'est pas réalisé en raison de l'aspect des billes de polystyrène : elles présentent un aspect sphérique, transparent et sont agglutinées en amas, ce qui rend difficile leur distinction et par conséquent leur comptage.

L'agglutination en amas peut s'expliquer par l'hydrophobie, ce qui rejoint l'hypothèse précédemment émise.

Conclusion :

Le dénombrement et la détermination de taille par filtration sur membrane n'est pas applicable au standard externe constitué de billes calibrées de polystyrène de tailles égales à $10 \mu\text{m}$ et $25 \mu\text{m}$, principalement pour 2 raisons :

- leur aspect agglutiné au microscope
- les erreurs de mesures inacceptables engendrées par les opérations de manipulation (pipetage et dilution)

Cette conclusion peut être généralisée à d'autres standards, de toute nature physico-chimique. En effet, les standards externes peuvent avoir un aspect différent et non représentatif des particules blanchâtre analysées en routine. Il est possible de commander d'autres standards et de les tester, mais pour des raisons d'économie de temps, cela n'est pas réalisé.

Par ailleurs, le standard externe calibré perd son attrait principal qui est la valeur de référence -ou valeur théorique- et remet en question son utilisation même. Si les manipulations indispensables au test (opérations de transvasement, pipetage et dilution) en affectent la qualité, cette valeur de référence devra nécessairement être déterminée de nouveau, et à posteriori par d'autres méthodes internes qui restent à développer.

3.7.2.2 *Standard interne issu de la zone de production*

Compte tenu des difficultés rencontrées lors de l'utilisation d'un standard externe de billes calibrées, on s'oriente vers un échantillon de particules visibles et non-visibles (standard interne ou *in-house*) récolté en zone de production : en effet, comme nous l'avons précédemment vu, tout procédé génère inévitablement des particules. Et bien que les multiples précautions prises limitent considérablement la contamination particulaire en zone de production et au niveau des poches pour perfusion, nous allons évaluer la possibilité d'y récolter des particules et de s'en servir dans le cadre de ce travail.

Le principal avantage d'un tel choix est que les particules *in-house* sont probablement les plus représentatives de celles analysées en routine en termes de structure, nature physico-chimique et taille, bien que celles-ci soient de taille très hétérogène. Elles ne comprennent pas les autres éventuels contaminants minoritaires (particules de bois, fibres textiles, métal ou verre).

Les inconvénients majeurs sont :

- la difficulté de retrouver des particules en grande quantité dans une zone où leur présence est bannie et combattue par tous les moyens
- L'absence de valeur de référence qui doit être déterminée.

Dans les pages suivantes, nous allons déterminer un lieu adéquat pour la récolte de l'échantillon de particules, évaluer son applicabilité puis développer une méthode de quantification du contenu particulaire.

3.7.2.2.1 Récolte de l'échantillon de particules

Introduction :

Afin de réussir à isoler et collecter une grande quantité de particules, il est nécessaire de déterminer les principales sources de celles-ci en zone de production, et de définir le principal contributeur comme lieu exact de récolte.

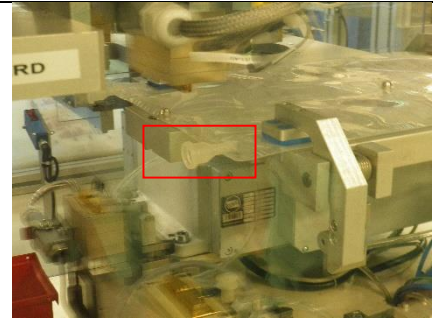

Les poches pour perfusion sont produites dans une ZAC de classe D, pouvant contenir jusqu'à 3.52×10^6 particules $\geq 0.5 \mu\text{m}$ par m^3 d'air et 29×10^3 particules $\geq 5 \mu\text{m}$ par m^3 d'air selon les BPF.

Méthode :

Une investigation sur les sources de contamination particulaire est menée sur chaque étape de production des poches et résumée dans le tableau suivant :

Tableau XIII – Analyse de risque de contamination particulaire durant le procédé de production

Etape en image	Brève description	Evaluation de la source de contamination particulaire
Formage des poches		
	<p>Déballage des bobines de film et installation sur la machine de formage</p>	<p>Présence de particules à l'intérieur des mandrins (noyau de la bobine, en matière synthétique)</p>
	<p>Impression sur le film et soudure pour le formage des poches et des compartiments</p>	<p>Résidus d'encre séchée ; particules générées par les cadres de sérigraphie</p>
	<p>Découpage des poches (séparation des poches et découpage des lisières du film)</p>	<p>La découpe génère des particules dans l'environnement de la même nature que le film</p>
	<p>Aspiration puissante des particules générées par le système de découpe</p>	<p>L'aspiration a, au contraire, pour objectif de réduire la contamination particulaire générée</p>
	<p>Contrôle visuel à la fin de la ligne de formage pour détecter toute anomalie</p>	<p>La contamination par les opérateurs, réduite par le port de tenues adéquates.</p>
	<p>Stockage des poches en attente de « queutage » (insertion des systèmes de fermeture), puis transfert dans la machine d'insertion des ports</p>	<p>-</p>
Insertion des systèmes de fermeture		
	<p>Ouverture des lieux d'insertion des systèmes de fermeture</p>	<p>Aspiration des particules vers l'intérieur des poches par le mouvement d'ouverture</p>

	<p>Insertion et soudure des systèmes de fermeture</p>	<p>Entrée des particules de l'environnement vers l'intérieur des poches</p>
	<p>Contrôle visuel des particules visibles avant conditionnement final</p>	<p>Manipulation de poches avec des ports ouverts. Cette étape a également pour objectif de réduire le risque de contamination des poches en rejetant les unités contaminées par des particules visibles.</p>

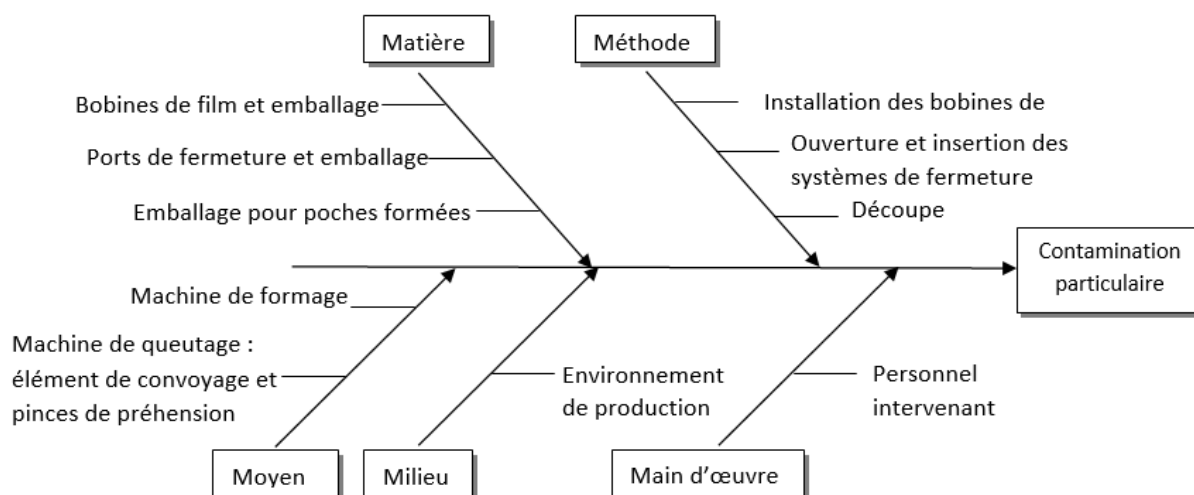


Figure n° 32 – Diagramme représentant les principales sources de contamination en zone de production

Discussion :

La contamination particulaire résulte certainement d'une combinaison entre tous les facteurs décrit, mais un élément apparaît comme le principal contributeur : l'étape de découpe des poches par un couteau en céramique.

De plus, l'état d'usure de ce dernier doit également être considéré : plus l'usure du couteau est prononcée, plus on y observe une quantité importante de poussière fine et blanchâtre attribuée au film plastique pouvant participer à la contamination des poches. Ces particules générées peuvent se retrouver en suspension dans l'environnement et être la principale source contamination des poches.

Il est important de mentionner que chacune de ces sources est ciblée par une batterie de mesures préventives visant à éliminer les particules générées, et à empêcher toute entrée en contact avec les poches pour perfusions produites. Ces mesures incluent notamment le renouvellement permanent

de l'air de la ZAC, les audits chez le fournisseur de film plastique visant à réduire les particules dans les matières premières, la formation du personnel, l'élimination des particules générées par un aspirateur puissant ainsi que le nettoyage et entretien des équipements (dont le couteau de découpe).

Le laboratoire B.Braun réalise une évaluation périodique des mesures prises au regard de données collectées, tel que le monitoring environnemental de la ZAC.

L'efficacité de ces mesures peut s'apprécier directement au niveau de la qualité des poches pour perfusion produites, qui sont non seulement toujours conformes à 40 % des limites compendiales, mais dont la teneur faible, voire même nulle, en particules est démontrée par les études de suivi internes ; toute valeur non attendue (OOE) pouvant donner lieu à des enquêtes investigatrices puis des mesures correctives et préventives.

Conclusion :

L'étape de découpe des poches par un couteau en céramique est retenue pour la récolte de l'échantillon de particules, servant comme standard de référence.

A la fin d'une session de production, la machine de formage est arrêtée par les opérateurs de maintenance pour les divers nettoyages et changements d'équipements :

- démonter l'appareillage pour accéder au couteau de découpe ayant servi à la précédente session
- récolter à l'aide d'un écouvillon la poussière fine et blanchâtre qui s'y est déposée
- la mettre en suspension dans un flacon en verre de 250 ml rempli d'eau exempte de particules
- terminer la préparation de cette suspension de particules par traitement aux ultrasons visant à casser les amas particulaires.

A noter que le flacon en verre a préalablement subi un traitement de 15 minutes aux ultrasons après rinçage à l'eau exempte de particules, avec le même objectif : le rendre exempt de particules.

3.7.2.2.2 Evaluation de l'applicabilité du standard interne

Introduction :

Le standard interne se présente sous forme d'une suspension de particules visibles et non-visibles de taille et nombre inconnus.

Objectif est stratégie :

De même que l'évaluation du standard de billes de polystyrène, le test qui suit a pour objectif d'évaluer l'utilisabilité de ce standard. Sa stratégie repose sur la détermination de la valeur de référence dans des conditions semblables à celles décrites dans la méthode de test, en prenant les mêmes précautions particulières décrites dans le test précédent.

Méthode d'analyse :

a) Blocage de la lumière :

La suspension de particules est analysée comme suit :

- Transvaser un volume suffisant (> 25 ml) dans un bécher préalablement rincé à l'eau exempte de particules, et traité 15 minutes aux ultrasons.
- Placer l'échantillon au centre de la cible du compteur
- Faire descendre la sonde de prélèvement à 1 cm du fond de l'échantillon
- Réaliser quatre cycles de mesures : le résultat du premier test est rejeté car il sert au rinçage de l'appareillage de comptage, seuls les 3 suivants servent à la récolte de résultats

b) Filtration sur membrane :

- Rincer une pipette de verre à l'eau exempte de particules
- Prélever environs 1 ml du standard interne et le filtrer sur la membrane de porosité 0.45 µm tel que décrit dans la méthode de test
- Analyser la membrane par microscopie
- Répéter l'opération 3 fois pour obtenir 3 résultats dans les mêmes conditions

Résultats :

a) Blocage de la lumière :

Tableau XIV – Résultat par blocage de la lumière de l'évaluation du standard externe

Taille des particules	Résultats (particules/ml)			Moyenne (particules/ml)	Ecart-type	Coefficient de variation (%) ¹
	N°1	N°2	N°3			
≥ 10 µm	525	522	505	517	11	2.1
≥ 25 µm	243	230	232	235	7	3.0

$$^1 CV = \frac{\text{Ecart-type}}{\text{Moyenne}}$$

b) Filtration sur membrane :

Tableau XV – Résultat par filtration sur membrane de l'évaluation du standard externe

Taille des particules	Résultats (particules/ml)			Moyenne (particules/ml)	Ecart-type	Coefficient de variation (%)
	N°1	N°2	N°3			
≥ 10 µm	215	618	285	372	215	57.8
≥ 25 µm	156	365	188	236	112	47.5

Discussion :

a) Blocage de la lumière :

L'écart entre les 3 essais est faible : les 3 prélèvements présentent un nombre de particules sensiblement proches.

b) Filtration sur membrane :

Il y a un écart important entre les 3 résultats, probablement dû à l'inhomogénéité de la préparation (suspension de particules dans l'eau), conduisant à des prélèvements non homogènes, ceci en dépit du traitement aux ultrasons et des volumes de prélèvement précis et égaux.

Il sera donc difficile de doper les poches pour perfusion avec des quantités égales de ce standard.

Par ailleurs, les particules se présentent au microscope sous forme d'entités individuelles, bien séparées les unes des autres, de formes irrégulières et d'aspect blanchâtre, sans formation d'agrégats.

Elles ont une apparence similaire aux particules non-visibles retrouvées en routine dans les poches vides, telle qu'illustré dans l'image ci-dessous.

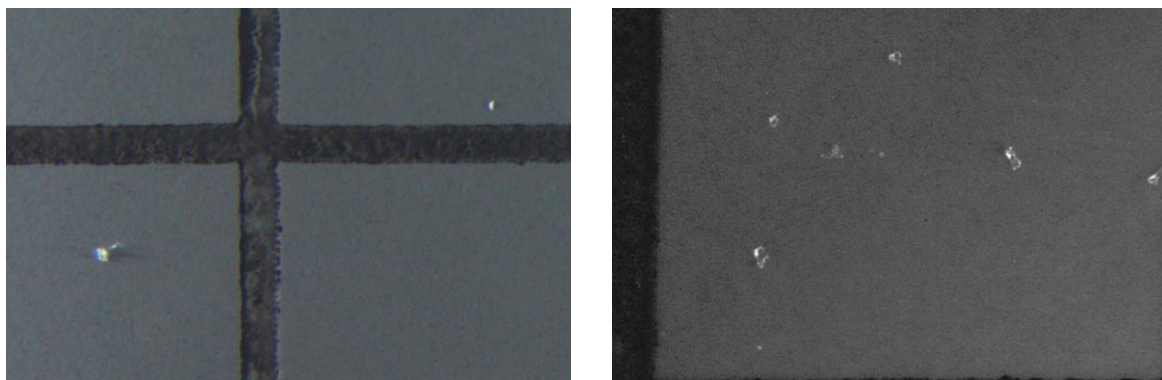


Figure n° 33 – Vue sous le microscope au grossissement de 20 fois des particules du standard interne (à droite) et celles analysées en routine (à gauche)

Comparaison standard interne vs standard externe :

Tableau XVI – Comparaison entre les 2 types de standards (externe et interne)

Paramètre de comparaison et d'évaluation		Standard externe (par ex. billes de polystyrène)	Standard interne récolté en zone de production
Valeur théorique	Avantage	Taille homogène et nombre préalablement connus et fournis par le fabricant dans le certificat de calibration	-
	Inconvénient	Valeur théorique est biaisée par les opérations du test, et doit être déterminée de nouveau par une méthode restant à définir	Tailles hétérogènes ¹ , nombre devant être déterminés par une méthode qui reste à définir
Aspect	Avantage	-	Représentatif des particules analysées en routine
	Inconvénient	L'aspect agglutiné ne permet pas l'analyse du standard	-

¹ Ce qui est un inconvénient peut aussi être considéré comme un avantage : le fait que les particules présentent des tailles hétérogènes constitue un critère de similitude aux particules retrouvées en routine.

Bien qu'il soit possible de tester plusieurs standards externes jusqu'à trouver celui qui présente le plus de similitudes avec les particules retrouvées en routine, l'utilisation d'un standard interne apparaît plus intéressante car elle requiert moins de temps, sans plus d'effort pour la détermination d'une valeur de référence que le standard externe.

Conclusion :

Le dénombrement et la détermination de taille par filtration sur membrane est applicable au standard interne constitué d'un échantillon de particules récoltées en zone de production. Celui-ci présente sous le microscope un aspect similaire à celui des particules analysées en routine, mais l'inhomogénéité de la préparation ne permet pas la détermination d'une valeur de référence unique pour tous les prélèvements.

La solution retenue consiste à doper chaque poche avec une contamination particulière inconnue, et de récupérer celle-ci après plusieurs rinçages dont le nombre est à définir. La valeur de référence sera déterminée de manière individuelle pour chaque poche, par addition des valeurs de tous les rinçages. Les particules contenues initialement dans les poches feront, de ce fait, partie de cette valeur de référence.

3.7.2.2.3 Développement d'une méthode de quantification du standard

Introduction :

Le développement d'une méthode de quantification du standard a pour objectif de déterminer un nombre N d'extractions (ou rinçages successifs) nécessaires à la récupération de la majeure partie des particules non visibles contenues dans les poches.

La somme des particules extraites lors de ces rinçages successifs sert à déterminer la contamination particulaire initiale (valeur de référence) pour le calcul du taux d'extraction (ou recouvrement) – principal objet de cette optimisation- selon la formule :

$$\text{Taux de recouvrement (\%)} = \left(\frac{\text{Comptage des particules au premier rinçage}}{\text{Somme des comptages de particules des N rinçages}} \right) \times 100$$

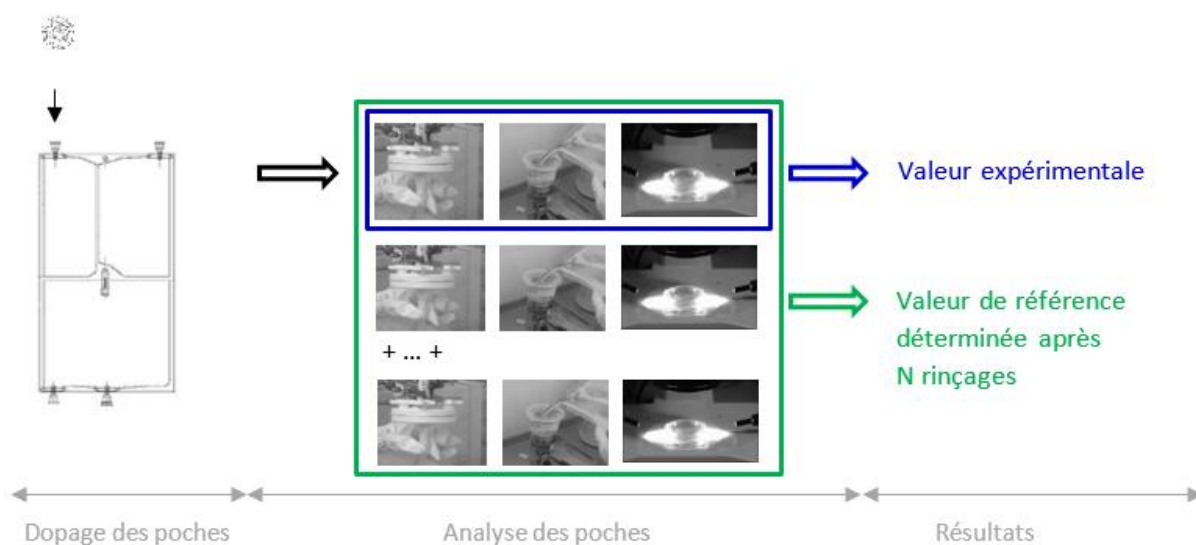


Figure n° 34 – Illustration des valeurs expérimentale et de référence, déterminée après N rinçages

Stratégie :

La stratégie de ce test repose sur l'exploration du profil d'extraction des particules lors de 10 rinçages successifs de 3 poches, préalablement dopées à l'aide du standard interne.

Les poches utilisées correspondent au *worst case* (2500 ml, 3 compartiments), ainsi les résultats pourront être généralisés à tout type de poche.

Les résultats attendus impliquent la baisse du nombre de particules extraites à partir des poches au fur et à mesure des rinçages. Lorsque le nombre de particules extraites cessera de diminuer de manière significative d'une extraction à l'autre, ceci indique que le nombre de rinçage N est atteint.

Méthode :

L'utilisation de 3 poches permet de récolter suffisamment de données, et le dopage des poches sert à augmenter la contamination particulaire de départ pour distinguer significativement l'évolution du nombre de particules en fonction des extractions successives.

Celles-ci sont réalisées selon la méthode de test utilisée en routine par le laboratoire B.Braun , mais avec les différences suivantes :

Tableau XVII – Comparaison entre la méthode de test et le protocole de développement de la méthode de quantification du standard interne

Paramètre de comparaison	Méthode de test	Protocole d'optimisation
Volume filtré ¹	500 ml	2500 ml
Comptage des particules ¹	Partiel, sur 8 fenêtres	Complet, sur l'intégralité de la membrane
Grossissement ²	90 fois	60 fois
Nombre d'extractions	1	10

¹ Permet de s'affranchir des approximations. La filtration partielle sera évaluée lors de la validation.

² Constitue le meilleur compromis permettant à la fois une bonne observation des petites particules, et demandant un balayage moins important de l'ensemble de la membrane.

Dans le dernier point de comparaison, on réalise 10 extractions, la première opération diffère des 9 suivantes, toutes similaires. Le tableau suivant liste les points de différence :

Tableau XVIII – Comparaison entre la 1^{ère} extraction et les neuf suivantes lors du protocole de développement d'une méthode de quantification du standard interne

Etape	1 ^{ère} extraction	9 extractions suivantes
Remplissage	par les ports	Par l'ouverture qui a servi à la 1 ^{ère} filtration
Bouchage	avec la colle appliquée sur les ports	clamper l'ouverture : ne pas la souder pour l'utiliser lors des remplissages suivants.
Rupture des soudures pelables	Oui	non réalisée : Les soudures sont déjà rompues, cette opération est unique et effectuée lors de la 1 ^{ère} extraction.
Ouverture aux ciseaux	Oui	non réalisée : la poche est déjà ouverte lors de la 1 ^{ère} extraction.

Lors de l'étape de bouchage, les poches sont clampées et reposent sous le flux laminaire environ 24 heures, entre les extractions successives, et pas 12 heures comme indiqué dans la norme ISO 15747, et ce pour des raisons pratiques.

Ce clamping est susceptible d'avoir un impact important. En effet, entre les extractions successives, il est important d'opter pour un mode de bouchage qui permet de garder inchangé le nombre de particules contenues dans chaque poche. A cet effet, différents moyens ont été évalués:

- 1- Bouchons en bromobutyl
- 2- Papier aluminium
- 3- Parafilm®
- 4- Clamp

Les 3 premières propositions sont insatisfaisantes : même après plusieurs rinçages à l'eau exempte de particules, et un traitement aux ultrasons, ils continuent d'apporter une contamination secondaire. Seule la quatrième proposition est jugée satisfaisante et a donc été retenue.

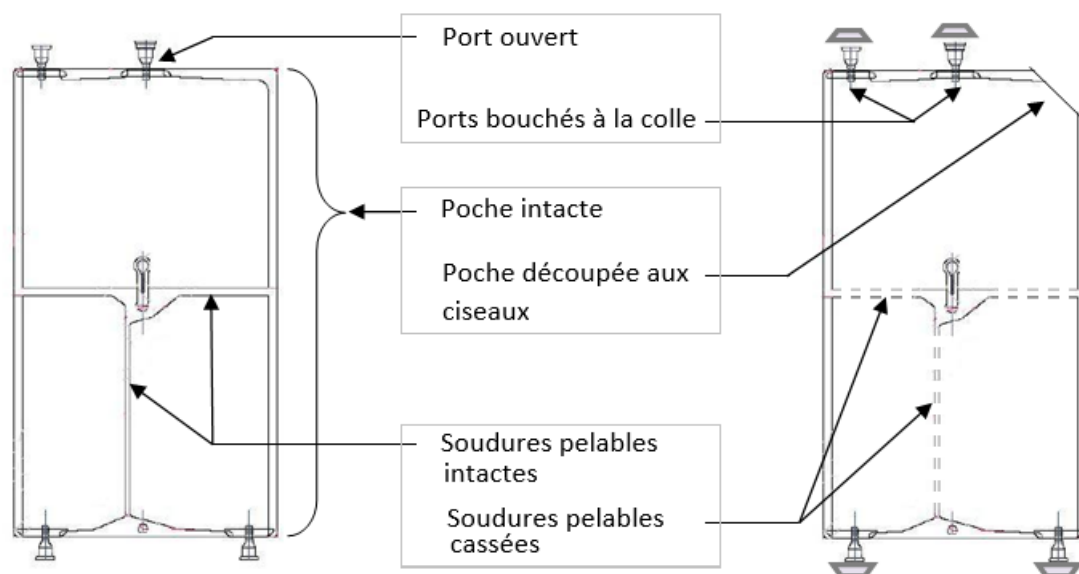


Figure n° 35 – Illustration d'une poche vide avant la 1^{ère} extraction (à gauche) et avant chacune des 9 extractions suivantes (à droite)

Résultats :

Le tableau suivant résume les résultats de comptage particulaire durant les 10 opérations d'extractions, sans distinction de taille. Les résultats détaillés par taille sont en annexe 5.

Tableau XIX – Nombre de particules extraites et taux de recouvrement lors de 10 extractions successives

N° d'extraction	Poche 1		Poche 2		Poche 3	
	Nombre de particules	Recouvrement ¹	Nombre de particules	Recouvrement ¹	Nombre de particules	Recouvrement ¹
1	610	41 %	443	32 %	387	58 %
2	197	54 %	238	49 %	58	67 %
3	175	65 %	96	56 %	18	70 %
4	46	68 %	23	58 %	21	73 %
5	63	73 %	37	61 %	17	76 %
6	20	74 %	19	62 %	34	81 %
7	238 ⁽²⁾	90 %	257 ⁽²⁾	81 %	39	87 %
8	118	98 %	155	92 %	35	92 %
9	17	99 %	61	97 %	28	96 %
10	19	100 %	48	100 %	25	100 %
Total	1503	-	1120	-	662	-

¹Recouvrement (%) = $\frac{(\text{Sommes particules extraites lors des précédents rinçages}) \times 100}{\text{Total des particules extraites lors des 10 extractions}}$

Par exemple, pour l'extraction 2 de la poche 1 : $\text{Recouvrement} = \frac{(610+197) \times 100}{1503} = 54 \%$

² Ces résultats sont inattendus. Pour la poche 1, on a compté 173 particules de taille $\geq 10 \mu\text{m}$ mais $< 25 \mu\text{m}$, et 65 particules $\geq 25 \mu\text{m}$, et pour la poche 2, 161 particules de taille $\geq 10 \mu\text{m}$ mais $< 25 \mu\text{m}$, et 96 particules $\geq 25 \mu\text{m}$.

1) Poche 1 :

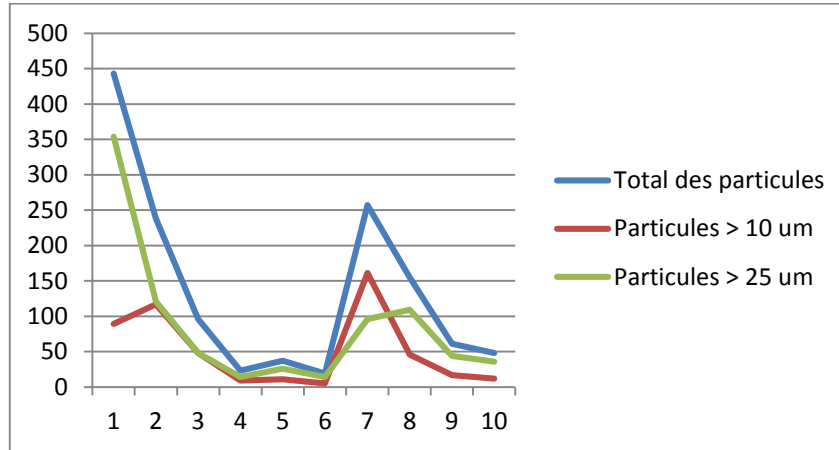


Figure n° 36 – Profil d'extraction des particules au cours des rinçages successifs (poche 1)

2) Poche 2 :

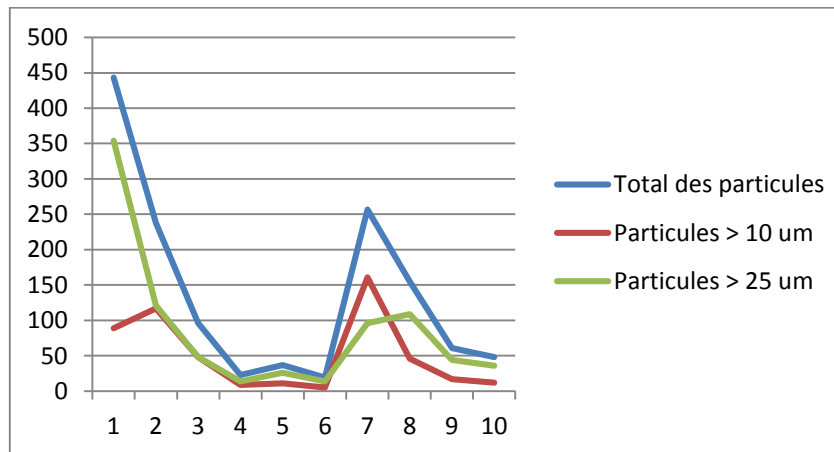


Figure n° 37 – Profil d'extraction des particules au cours des rinçages successifs (poche 2)

3) Poche 3 :

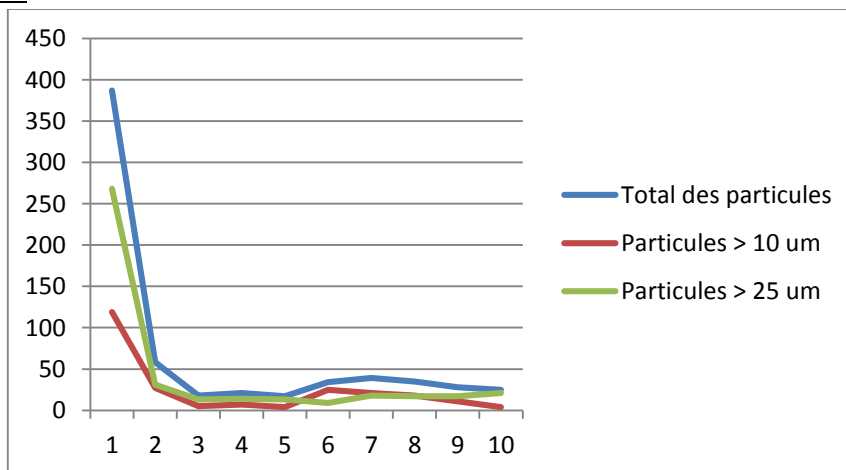


Figure n° 38 – Profil d'extraction des particules au cours des rinçages successifs (poche 3)

Discussion :

Pour les poches 1 et 2, il y a une probable contamination secondaire à l'origine de l'augmentation subite du nombre de particules à la 6^e extraction, suivie d'une baisse progressive au cours des rinçages suivants.

Pour la poche 3, bien qu'une légère hausse soit observée à la 6^e extraction, ce même phénomène n'a pas la même ampleur et peut être négligé. On considère que le nombre de particules diminue progressivement et se stabilise au cours des rinçages.

Afin de s'affranchir du biais causé par cette contamination des poches 1 et 2, seules les six premières extractions sont prises en compte. Cependant, pour conclure de manière homogène entre les 3 poches, le retraitement des données est général et aboutit à de nouvelles valeurs de taux de recouvrement :

Tableau XX – Nombre de particules extraites et taux de recouvrement de 6 extractions successives

N° d'extraction	Poche 1		Poche 2		Poche 3	
	Nombre de particules	Recouvrement ¹	Nombre de particules	Recouvrement ¹	Nombre de particules	Recouvrement ¹
1	610	55 %	443	52 %	387	72 %
2	197	73 %	238	80 %	58	83 %
3	175	88 %	96	91 %	18	87 %
4	46	93 %	23	93 %	21	90 %
5	63	98 %	37	98 %	17	94 %
6	20	100 %	19	100 %	34	100 %
Total	1111	-	856	-	535	-

On peut observer que les 6 extractions font baisser le nombre de particules de 610 à 20, de 443 à 19, et de 387 à 34 respectivement dans les 3 poches, et qu'à partir de la 4^e extraction, le taux de recouvrement atteint au moins 90%, ce qui est largement acceptable.

De manière générale, si l'on considère que 4 rinçages sont nécessaires à l'extraction de 90% des particules, on peut normaliser les résultats par l'application d'un facteur de correction $\sim \frac{10}{9}$, calculé selon la règle de 3 :

$$\frac{\text{Nombre de particules compté}}{\text{Nombre de particules normalisé}} \rightarrow \frac{90\%}{100\%} \Rightarrow \text{Nombre de particules normalisé} = \frac{\text{Nombre de particules compté} \times 100\%}{90\%}$$

Cependant, il apparaît évident qu'il n'est pas possible, dans les conditions du test, de rendre les poches complètement exemptes de particules en retirant tout le contenu particulaire, bien que toutes les précautions aient été prises en ce sens. En effet, le nombre de particules extraites le plus bas correspond à 17 particules (5^e extraction pour la poche 3).

Il subsiste en effet un bruit de fond incompressible à chaque extraction, qui n'est certainement détectable qu'en dessous d'un certain seuil de contamination particulaire : lorsque les poches pour perfusion contiennent un nombre élevé de particules, la contamination secondaire est négligeable.

Par ailleurs, la manipulation des poches d'une extraction à l'autre est probablement source de génération de particule, en particulier au niveau des soudures du contour de poche et des soudures pelables.

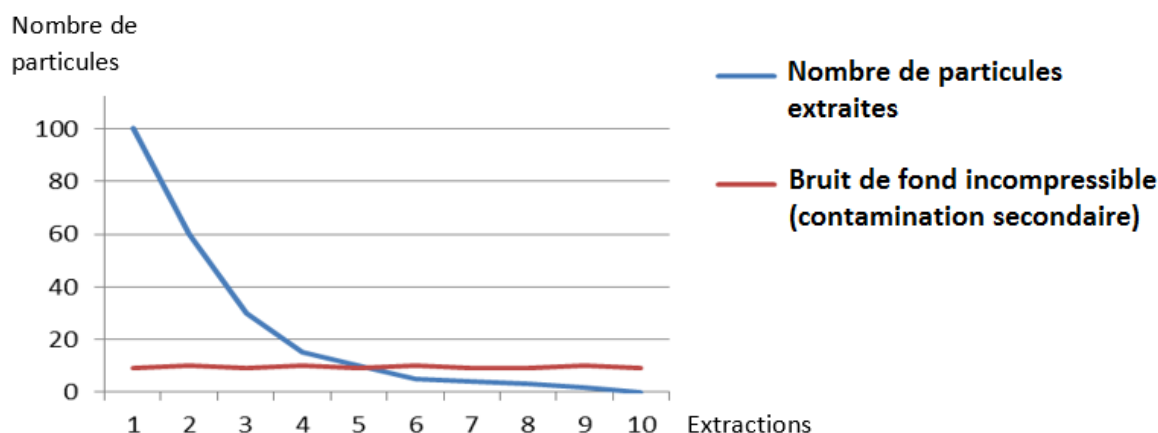


Figure n° 39 – Illustration schématique de l'extraction des particules au fur et à mesure des rinçages successifs, avec présence d'un bruit de fond de contamination secondaire

Ce bruit de fond provient probablement d'une contamination secondaire inhérente à la méthode de test et correspond aux 10% résiduels. C'est pourquoi ils ne doivent pas être inclus dans les résultats, et le facteur de correction ne doit pas être mis en place.

Bien qu'il apparaisse plus juste de soustraire 10% du nombre de particules à chaque extraction, cela risque de sous-évaluer les résultats, et il est préférable de négliger ce phénomène.

Par ailleurs, ces résultats rejoignent l'observation déjà faite (3.6 Analyse de risque) que la contamination secondaire est causée principalement par des particules fines. En effet, lors de la 6^e extraction des poches 1 et 2, on observe plus de particules de taille < 25 µm que de particules ≥ 25 µm.

Conclusion :

Ce test a permis de mettre en évidence que quatre est le nombre **N** de rinçages nécessaire à l'extraction de la contamination particulaire initiale contenue dans les poches : à la 4^e extraction, plus de 90% des particules sont extraites à l'aide du solvant. Les particules résiduelles correspondant à 10% sont négligeables et considérées comme étant dues à une erreur systématique inhérente à la méthode.

La valeur de référence du standard interne peut donc être calculée par la somme des particules extraites par 4 rinçages.

Ainsi, le taux de recouvrement est calculé selon la formule :

$$\text{Taux de recouvrement (\%)} = \left(\frac{\text{Comptage des particules au premier rinçage}}{\text{Somme des comptages de particules des 4 rinçages}} \right) \times 100$$

Notons que ce nombre de quatre rinçages est mis au point dans le cadre de ce travail. En effet, son usage en routine n'est pas optimal en raison des opérations chronophages.

3.7.2.3 Sélection du solvant optimal pour l'extraction des particules

Introduction :

Le solvant de rinçage utilisé dans la méthode de test est l'eau additionnée de 0.1% de polysorbate 80 : des données rétrospectives, internes au laboratoire B.Braun, avaient permis d'établir qu'il présente un meilleur taux d'extraction que l'eau seule.

Choix des solvants à tester :

Le polysorbate 80 joue un rôle de tensioactif à des concentrations comprises entre 0.1 et 3% selon le *Handbook of pharmaceutical excipients*, et il convient d'évaluer les deux extrémités. Bien que dans la norme ISO 8871-3, le liquide de rinçage est préparé à une concentration de $0.3 \times 10^{-3}\%$ de polysorbate 80, on retient la concentration de 0.1% pour ce test, afin de s'assurer qu'il agit comme tensioactif en présence de particules hydrophobes. [3]

Selon la norme ISO 15747, une solution de perfusion peut être également utilisée comme solvant de rinçage, la plus simple étant le chlorure de sodium 0.9% (solution isotonique au sang). Ce solvant est également cité dans l'USP <88> pour l'extraction d'élastomères pour des tests de réactivité in vivo, chez l'animal, et peut constituer donc un solvant de choix.

D'autres solutions de perfusion ont été envisagées mais écartés (la solution lipidique ou l'huile de Soja), pour des difficultés pouvant être rencontrées lors de l'étape de filtration à $0.2\mu\text{m}$:

- L'huile de Soja présente une viscosité pouvant colmater le filtre.
- La solution lipidique est une émulsion contenant des particules dispersées non miscibles de taille micrométrique, qui peuvent être retenue par le filtre.

Méthode :

Quatre conditions sont testées, chacune sur 5 poches homogènes *worst case* préalablement dopées de standard interne, puis rincées 4 fois successivement afin de déterminer la valeur de références.

Tableau XXI – Quatre conditions du test d'optimisation de solvant

Condition	Solvant	Concentration de polysorbate 80 (%)
1	Eau	0.1
2		3
3	chlorure de sodium	0.1
4		3

Le volume filtré est total, et le comptage des particules est réalisé sur la membrane intégrale à un grossissement de 60 fois, pour s'affranchir des approximations et permettre une évaluation précise et optimale des données.

Les taux d'extraction des quatre conditions sont calculés et comparés, et le solvant optimal est celui qui permet d'obtenir de manière significative le taux le plus élevé.

Résultats :

Le résultat exprime la somme des comptages de particules ≥ 10 et $25\mu\text{m}$, réalisées sur 2 membranes issues de la filtration d'un volume de 500 ml puis 2000 ml, séparément, afin d'abaisser la surcharge en particules des filtres et faciliter le dénombrement.

Tableau XXII – Conditions testées pour l'optimisation de la méthode

Condition	Solvant	Concentration de polysorbate 80 (%)	Taux de recouvrement	
			Moyenne (%)	Ecart-type
1	Eau	0.1	87.4	7.3
2		3	92.1	2.6
3	Chlorure de Sodium	0.1	87.9	13.1 ⁽¹⁾
4		3	85.9	7.0

¹ Les taux pour cette condition de test sont les suivants : 95.4% - 95.6% - 88.4% - 95.0% - 65.1%.

Les données brutes sont en annexe 6.

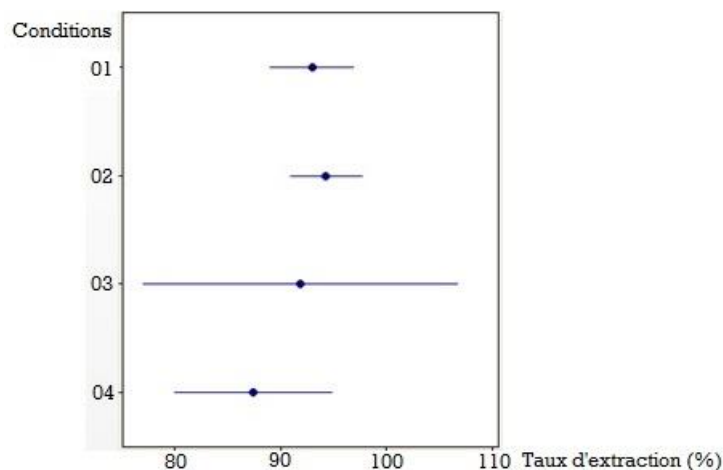


Figure n° 40 – Comparaison des taux d'extraction moyens des quatre solvants test ANOVA (à l'aide du logiciel Minitab)

Discussion :

Les taux d'extraction moyens sont tous compris dans le quartile haut.

Pour la 3^e condition, l'écart-type est relativement plus élevé en raison d'une valeur qui peut être considérée comme aberrante (taux d'extraction égal à 65.12 %), probablement due à une contamination secondaire au cours des extractions successives, où le nombre des particules est passé de 176 à 240 au lieu de diminuer (voir annexe 6).

Un test ANOVA (sur le logiciel Minitab) permet de comparer les quatre taux d'extraction moyens et les évaluer statistiquement équivalents, avec une valeur-p de 0.324 ($p > 0.05$). Même après élimination de la valeur aberrante, le taux d'extraction de $93.6 \pm 3.5\%$ change peu les résultats.

Le solvant qui présente le moins de contraintes est l'eau supplémentée de 0.1 % de polysorbate 80 : l'eau ROW est d'une utilisation plus pratique que la solution de chlorure de sodium, et le polysorbate à 0.1% est moins visqueux à faible concentration donc plus facile à filtrer et générant moins de mousse.

Ce solvant est celui qui est déjà utilisée dans la méthode de test utilisée en routine, qui n'est en conséquent par modifiée à la suite de ces tests.

Conclusion :

Les différences ne sont pas suffisamment significatives pour permettre de distinguer un solvant plus optimal que les autres, et le solvant choisi est celui qui est déjà en place et présentant le moins de contraintes, avec un taux d'extraction de $87.4 \pm 7.3\%$.

Si l'on considère que les quatre solvants sont suffisamment équivalents pour être confondus, on aboutit à un taux d'extraction moyen de $88.3 \pm 8.0\%$ pour l'ensemble des quatre solvants.

3.7.2.4 Synthèse de l'optimisation de méthode

La méthode de comptage de particules non-visibles par microscopie dans les poches pour perfusion est candidate à la validation, dans l'objectif d'assurer la fiabilité de ses résultats.

Elle comporte globalement 3 phases : le remplissage par un solvant d'extraction, la filtration de ce solvant qui entraîne les particules non-visibles sur une membrane, et enfin le dénombrement au microscope par l'analyste.

La bonne connaissance de ses étapes et des paramètres entrant en jeu est d'une importance cruciale, elle a permis l'analyse de risque qui met en évidence les facteurs susceptibles de biaiser les résultats en faveur d'une surévaluation ou sous-évaluation, et qui sont principalement :

- Le facteur humain (l'analyste)
- La contamination secondaire durant l'analyse
- Le taux d'extraction des particules par le solvant adéquat

Ces éléments ont été exploités pour optimiser la méthode selon deux approches :

- Amélioration continue des pratiques de laboratoire pour réduire le risque d'erreurs
- Optimisation du taux d'extraction des particules par le choix d'un solvant

Bien que ce travail ait conduit à confirmer le solvant déjà employé dans la méthode de test, qui est l'eau exempte de particules additionnée de 0.1 % de polysorbate 80, ceci a permis de démontrer sa performance ainsi que le taux d'extraction des particules analysées en routine : $87.4 \pm 7.3\%$

Les principales plus-values de ce travail ne se limitent pas à l'optimisation de méthode, mais s'étendent à la validation dont il a permis de poser les bases, notamment par :

- La détermination d'une méthode de calcul du taux d'extraction selon la formule :
- **Taux de recouvrement (%) = $\left(\frac{\text{Comptage des particules au premier rinçage}}{\text{Somme des comptages de particules des 4 rinçages}} \right) \times 100$**
- La définition des spécifications du taux d'extraction à au moins 75%. Ce point sera traité dans le critère d'exactitude lors de la validation.

Ces résultats ont fait appel à plusieurs étapes : d'abord, la sélection d'un standard de particules qui apporte une valeur de référence. Celui-ci est constitué d'un échantillon de particules récoltées en zone de production au niveau du couteau de découpe des machines de fromage, considéré comme la principale source de contamination.

Ce standard se présente sous la forme d'une suspension inhomogène de particules qui, après filtration, a un aspect similaire aux particules analysées en routine. Leur nombre n'étant pas connu, une méthode interne a été développée pour le quantifier : elle consiste à doper les poches avec une quantité non connue de particules, puis à procéder à 4 rinçages successifs pour récupérer la totalité des particules initialement injectées, et d'en calculer la somme.

En effet, quatre rinçages successifs sont nécessaires à la récupération de la contamination particulaire initiale pour son dénombrement, nombre établi à la suite d'un test de dix rinçages successifs de 3 poches ayant démontré que quatre rinçages retiraient 90% des particules et qu'au-delà, la contamination particulaire atteignait un état d'équilibre entre les particules extraites et celles issues d'une contamination secondaire inhérente à la méthode d'analyse, que l'auteur juge négligeable.

Le taux de recouvrement moyen est de $88.3 \pm 8.0 \%$, observé globalement entre les 4 solvants, jugés équivalents, par un test ANOVA de comparaison des moyennes.

Une fois l'anatomie de la méthode établie, les conditions du test optimisées, la validation à proprement parler peut être abordé dans la partie suivante.

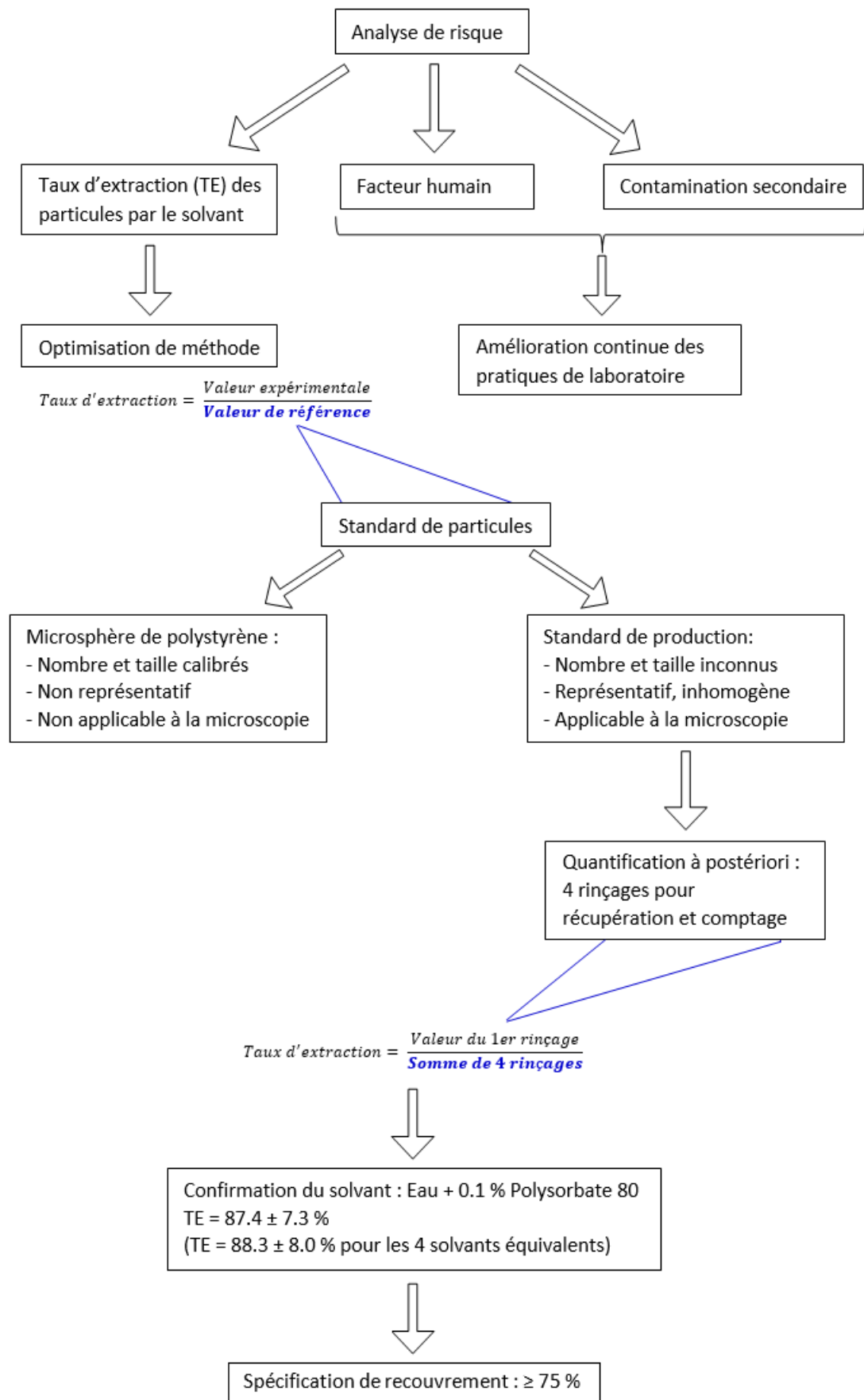


Figure n° 41 – Logigramme résumant les principales étapes et conclusions de l'optimisation de méthode

3.8 Validation de méthode

3.8.1 Introduction

L'objectif de la méthode est le comptage des particules non-visibles par microscopie, dans les poches pour perfusion vides.

La validation de la méthode permet de démontrer à travers des tests la fiabilité des résultats obtenus.

Dans les pages qui suivent, la validation est déployée en trois étapes :

- rappel des exigences de l'utilisateur
- évaluation des critères de validation et de leurs limites d'acceptation
- définition des protocoles de validation et réalisation.

3.8.2 Méthode

3.8.2.1 Les exigences de l'utilisateur

L'utilisateur évalue l'impact du médicament sur le patient, en se basant sur les résultats de contamination particulaire qui doivent refléter la qualité effective des poches vides.

Celles-ci sont destinées à être remplies par une solution de perfusion, et doivent présenter une contamination particulaire s'élevant au plus à 40 % des limites compendiales pour la poche de perfusion pleine.

L'utilisateur attend donc de la méthode la détermination du nombre de particules contenues par millilitre, par taille, afin de le comparer aux limites autorisées. Il est alors impératif de couvrir toute la gamme des résultats conformes, comme suit :

Tableau XXIII – Gamme de conformité par tranches de taille de particules

Taille de particules	Spécifications (particules/ml) ¹
≥ 10 µm	4.8
≥ 25 µm	0.8

¹ Correspond à 40 % des limites compendiales (12 particules/ml pour les particules ≥ 10 µm, et 2 particules/ml pour les particules ≥ 25 µm).

La méthode de test a été optimisée en confirmant le solvant de rinçage, et en réduisant le risque inhérent de contamination secondaire par l'environnement d'analyse ainsi que les erreurs humaines.

3.8.2.2 Les critères à valider

D'après les standards du groupe B.Braun, seule l'étude du critère de fidélité est requise pour les analytes de nature physiques, dont le comptage des particules. L'évaluation de la pertinence d'étudier ou non les autres critères de validation est à la charge de l'analyste et dépend des méthodes candidates à la validation.

Tableau XXIV – Evaluation des critères de validation de la méthode

Critère	Evaluation de la pertinence pour la validation
Critères à valider	
Exactitude	Valide le solvant choisi avec des données basées sur l'évidence démontrant sa capacité à extraire les particules des poches pour perfusion
Répétabilité	Valide la préparation de l'échantillon et l'environnement d'analyse (enceinte à flux laminaire et système de production d'eau exempte de particules)
Précision intermédiaire	Valide le facteur humain, par la comparaison entre 3 analystes différents

Critères à ne pas valider	
Reproductibilité	Non appropriée, la validation n'a pas pour but de standardiser la méthode.
Robustesse	L'optimisation de la méthode a permis de réduire le risque de contamination secondaire à son minimum, en se basant sur un rationnel. Les risques d'erreur pouvant présenter le plus grand impact de résultat erroné sont évalués dans les critères à valider
Linéarité	Selon toute logique, le résultat devrait être proportionnel à la quantité d'analyte présente, mais ce critère n'est pas validé au profit de l'exactitude, en raison des risques de contamination secondaire pouvant interférer avec le résultat
Intervalle de validité	Il requiert de tester la linéarité
Limite de détection	Les particules détectables sont quantifiables
Limite de quantification	Elle est plus adaptée aux impuretés et produits de dégradation
Spécificité	Il existe peu de risque d'interférence, tout ce qui n'est pas soluble est retenu par la membrane et répond donc à la définition de particule

3.8.2.3 Les critères d'acceptation

Pour la répétabilité et la précision intermédiaire, les standards du groupe B.Braun prévoient le critère d'acceptation $\leq 20\%$ [41].

Pour l'exactitude, celui-ci est à définir en se basant sur les données récoltées durant l'étape d'optimisation : le taux d'extraction (ou de recouvrement) est égal à $88.3 \pm 8.0\%$ (3.7.2.3 Sélection du solvant optimal pour l'extraction des particules). Il semble qu'une limite $\geq 75\%$ soit suffisante, en tenant compte des données récoltées tout en prenant une marge de sécurité supplémentaire.

Cela signifie que le solvant de rinçage doit extraire au moins 75 % de la contamination particulaire contenue dans une poche, ce qui est acceptable. Bien que l'extraction de 100% des particules soit une meilleure option, que ce soit lors d'un premier rinçage, ou en implémentant dans la méthode de test un nombre de rinçages suffisants pour toutes les extraire. Cependant, l'usage prévu pour les poches de perfusion est le remplissage par une solution parentérale qui sera perfusée une fois au patient, et qui justifie le rinçage unique pratiqué dans le cadre de la méthode de test.

Au regard de cette justification, un taux d'extraction $\geq 75\%$ est largement suffisant car il permet d'analyser une majeure partie de la contamination effective, et surtout la partie susceptible d'être transférée au patient pendant l'administration médicale.

Tableau XXV – Récapitulatif des critères de validation mis en place

Critère	Spécifications	Sources
Exactitude	$\geq 75\%$	Données rétrospectives d'optimisation de méthode
Répétabilité	$\leq 20\%$	Standards de validation du groupe B.Braun
Précision intermédiaire		

3.8.2.4 *Echantillons à analyser*

La validation est réalisée sur le *worst case* des poches pour perfusion vides, défini selon leur capacité à empêcher l'extraction des particules au moyen d'un solvant (3.6 Analyse de risque).

Le *worst case* est la poche de 2500 ml à 3 compartiments.

3.8.2.5 *Standard de particules*

Le standard employé est constitué d'un échantillon de particules récolté en zone de production et mis en suspension dans un flacon d'eau (3.7.2.2 Standard interne issu de la zone de production).

Le volume de standard injecté est calculé de manière à atteindre 40% des limites compendiales afin que la validation couvre toute la gamme de conformité et d'utilisation des poches pour perfusions.

3.8.2.6 *Tests exécutés pour chaque échantillon*

Chaque poche pour perfusion est dopée d'un volume de 7 ml de la solution de standard interne (annexe 7) et rincée 4 fois :

- Le premier rinçage correspond à l'exécution de la méthode de test.
- Les deuxième, troisième et quatrième correspondent aux rinçages nécessaires à l'extraction des particules résiduelles de standard pour sa quantification à posteriori, afin de calculer le taux de recouvrement selon la formule suivante :

$$\text{Taux de recouvrement (\%)} = \left(\frac{\text{Comptage des particules au premier rinçage}}{\text{Somme des comptages de particules des 4 rinçages}} \right) \times 100$$

Le solvant de rinçage est l'eau exempte de particules additionnée de 0.1% de polysorbate 80. Chaque poche est remplie à sa valeur nominale de 2500 ml, puis filtrée comme suit :

- 500 ml sont filtrés sur une première membrane, selon la méthode de test.
- 2000 ml sont filtrée sur une seconde membrane, servant évaluer la filtration partielle.

Le dénombrement de chaque membrane se fait en deux temps selon la méthode de test :

- Dénombrement partiel sur 8 fenêtres en forme de Z, à un grossissement de 90 fois, avec distinction de taille des particules $\geq 10 \mu\text{m}$ et $\geq 25 \mu\text{m}$, conformément à la Ph. Eur.
- Dénombrement total de la membrane à un grossissement de 20 fois sans distinction de taille, servant à évaluer le dénombrement partiel.

Les résultats servant au calcul des critères de validation correspondent au dénombrement partiel sur le volume de 500 ml (résultats exploités en routine).

Les autres servent à l'évaluation de la filtration partielle du solvant et du dénombrement partiel de la membrane.

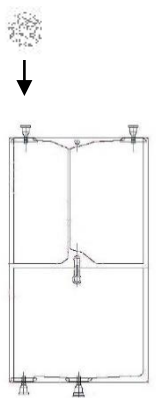

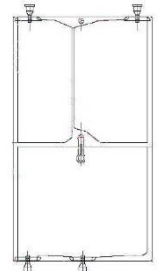

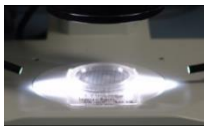
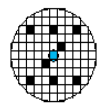

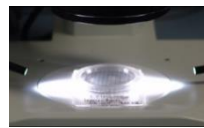
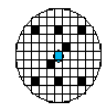


Injection de standard	Extraction 1			
	Remplissage	Filtration	Dénombrement	Résultats
	Volume = 2500 ml  	Volume = 500 ml 	 Grossissement : 20 fois Surface : totale Distinction de taille : non	Nombre de particules
			 Grossissement : 90 fois Surface : 8 fenêtres Distinction de taille : oui	
		Volume = 2000 ml 	 Grossissement : 20 fois Surface : totale Distinction de taille : non	Nombre de particules
			 Grossissement : 90 fois Surface : 8 fenêtres Distinction de taille : oui	
	Extraction 2 ¹			
	Extraction 3 ¹			
	Extraction 4 ¹			

Figure n° 42 – Schématique des tests réalisés sur chaque poche

¹ Similaires à l'extraction 1

 Résultats servant au calcul des critères de validation

 Résultats servant à l'évaluation de la filtration partielle et de dénombrement partiel

3.8.2.7 Protocole de validation

- L'exactitude est réalisée sur 6 échantillons, au sein du même équipement, par le même analyste, le même jour. Elle est évaluée moyennant le calcul du taux de recouvrement, et chaque valeur doit être conforme à la spécification.
- La précision est réalisée sur 6 échantillons, au sein du même équipement, par le même analyste, le même jour. Elle est évaluée moyennant le calcul du coefficient de variation (CV) entre les 6 résultats, ce dernier doit être conforme à la spécification.
- La précision intermédiaire est réalisée sur 3 échantillons, au sein du même équipement, le même jour, pour chacun des 3 analystes. Elle est évaluée moyennant le calcul du CV pour chacune des 3 séries et entre les 3 séries. Au final, les 4 CV calculés doivent être conforme à la spécification.

A noter que tous les échantillons de poches vides utilisés pour la validation sont réputés homogènes car produits consécutivement dans un même lot.

En effet, pour effectuer ces tests, la ligne de production des poches vides a produit un lot spécifiquement destiné à cet effet, en numérotant chacune des poches chronologiquement.

Tableau XXVI – Récapitulatif du protocole de validation

Critère de validation	Critère d'acceptation	Nombre d'échantillons	Conditions
Exactitude	Taux de recouvrement $\geq 75\%$	6	Même équipement Même jour
Précision	CV $\leq 20\%$	6	Même analyste
Précision intermédiaire	CV $\leq 20\%$ mesuré entre les 3 résultats de chaque analyste, et entre les 3 séries des 3 analystes	3 x 3	Même équipement Même jour Trois analystes

Notons que le CV est calculé à partir des taux de recouvrement au lieu des résultats expérimentaux de la première extraction, afin de normaliser la contamination particulière entre les échantillons, et donc contourner l'inhomogénéité des contaminations particulières injectées aux poches pour perfusion.

Afin d'optimiser la matrice des tests, certains échantillons serviront à la validation de plusieurs critères, comme suit :

Tableau XXVII – Matrice des échantillons par critère de validation

Echantillons	Critères de validation		
	Exactitude	Répétabilité	Précision intermédiaire
1 – 2 – 3	x	x	
4 – 5 – 6			x (analyste 1)
7 – 8 – 9			x (analyste 2)
10 – 11 – 12			x (analyste 3)

3.8.3 Résultats

Les données brutes figurent en annexe 8.

3.8.3.1 Exactitude

Tableau XXVIII – Résultats du critère d'exactitude

Echantillon	Taux de recouvrement (%)	Limite d'acceptation (%)
1	100	≥ 75
2	100	
3	99	
4	99	
5	99	
6	96	
Moyenne	99	

3.8.3.2 Précision

Tableau XXIX – Résultats du critère de précision

Echantillon	Taux de recouvrement (%)	CV (%)	Limite d'acceptation (%)
1	100	2	≤ 20
2	100		
3	99		
4	99		
5	99		
6	96		

3.8.3.3 Précision intermédiaire

Tableau XXX – Résultats du critère de précision intermédiaire (pour chaque série)

Analyste	Echantillon	Taux de recouvrement (%)	CV (%)	Limite d'acceptation (%)
1	4	99	2	≤ 20
	5	99		
	6	96		
2	7	99	1	
	8	98		
	9	100		
3	10	97	2	
	11	100		
	12	100		

Tableau XXXI – Résultats du critère de précision intermédiaire (entre les 3 séries)

Analyste	Echantillon	Taux moyen de recouvrement (%)	CV (%)	Limite d'acceptation (%)
1	4 – 5 – 6	98	1	≤ 20
2	7 – 8 – 9	99		
3	10 – 11 – 12	99		

3.8.4 Discussion

Les critères de validation sont conformes aux critères d'acceptation, et tous les résultats sont conformes au critère d'exactitude (≥ 75%).

Les taux d'extraction sont très élevés, l'écart entre les résultats lors du test de répétabilité est très faible, ainsi que celui observé entre 3 analystes.

Basé sur 12 résultats de la première extraction d'un volume de 500 ml de solvant correspondant à l'exécution de la méthode de test, le standard de particules couvre la gamme de conformité et d'utilisation des poches pour perfusion de :

- 17.9 ± 9.5 particules/ml de taille $\geq 10 \mu\text{m}$.
- 10.5 ± 5.3 particules/ml de taille $\geq 25 \mu\text{m}$.

A titre indicatif, notons que les tailles des particules du standard se répartissent comme suit :

Particules $\geq 10 \mu\text{m}$	64 %
Particules $\geq 25 \mu\text{m}$	36 %

Dans la suite de ce chapitre, nous allons exploiter les données satellites récoltées de deux manières :

- envisager une autre approche de validation de la méthode, en utilisant les données récoltées en routine à titre indicatif : dénombrement des particules sur la totalité de la membrane à un grossissement de 20 fois, après filtration de 500 ml du solvant.
- Evaluer la filtration partielle du volume et le dénombrement partiel de la membrane.

3.8.4.1 Approche alternative de validation

Tableau XXXII – Résultat des taux de recouvrement (approche alternative)

Analyste	Echantillon	Taux de recouvrement (%)
1	1	92
	2	95
	3	94
	4	93
	5	98
	6	85
2	7	96
	8	95
	9	94
3	10	89
	11	96
	12	93

Tableau XXXIII – Evaluation des critères de validation (approches alternative)

Critère de validation		Résultats (%)	Limites d'acceptation (%)
Exactitude		Moyenne = 93	≥ 75
Répétabilité		CV = 4	≤ 20
Précision intermédiaire	Analyste 1	CV = 6	
	Analyste 2	CV = 1	
	Analyste 3	CV = 3	
	Entre les 3 séries	CV = 2	

Ces résultats sont en accord avec ceux de la précédente approche.

3.8.4.2 Evaluation de la filtration partielle du volume du solvant

Le premier rinçage réalisé dans le cadre de la validation correspondant à l'exécution de la méthode de test, c'est donc celui qui est considéré pour cette évaluation.

La distinction de taille n'ayant pas d'importance dans cette étude, le dénombrement à grossissement de 20 fois est donc considéré pour calculer la proportion des particules comptées par la formule suivante :

$$\text{Proportion} = \frac{A}{(A + B)}$$

Où :

A = Nombre de particules contenues dans 500 ml

B = Nombre de particules contenues dans 2000 ml

Cette proportion est rapporté au $\frac{1}{5}$ ^{ème}, qui correspond à la proportion du volume filtré, et aboutit au calcul du recouvrement tel que :

$$\text{Recouvrement (\%)} = \text{Proportion} \times 5 \times 100$$

Ce recouvrement doit être le plus proche possible de 100%.

Tableau XXXIV– Recouvrement des proportions de particules contenues dans les volumes filtrés (500-2000ml)

Echantillon	Particules dénombrées		Recouvrement (%)	Analyste réalisant le dénombrement (500ml/2000ml)
	Membrane de filtration de 500 ml	Membrane de filtration de 2000 ml		
1	2017	6495	118	(1/1)
2	2340	9384	100	(1/1)
3	1798	7346	98	(1/1)
4	3122	6482	163	(1/1)
5	8837	11929	213	(1/1)
6 ¹	988	3950	-	(1/1)
7	1651	4866	127	(1/2)
8	1733	6805	101	(1/2)
9	1860	11220	71	(1/2)
10	1153	9248	55	(1/3)
11	1056	7853	59	(1/3)
12	1465	11592	56	(1/3)

¹ Cette ligne n'est pas prise en compte : données calculés à partir d'un volume de 2500ml par division à l'aide d'un facteur 5 en raison d'une déviation au protocole de test : lors du 1^{er} rinçage, tout le volume de 2500 ml a été filtrée par erreur sur une seule membrane. Aucune autre déviation au protocole n'a été reportée.

La moyenne est à 106% avec un écart-type de 49%. La moyenne est très proche du 100% attendu, mais il existe quatre valeurs très éloignées allant de 55 % à 213%.

Les disparités peuvent avoir pour origine un effet analyste-dépendant, notamment pour les échantillons 10 à 12 qui présentent des résultats très bas et ont en commun l'analyste 3.

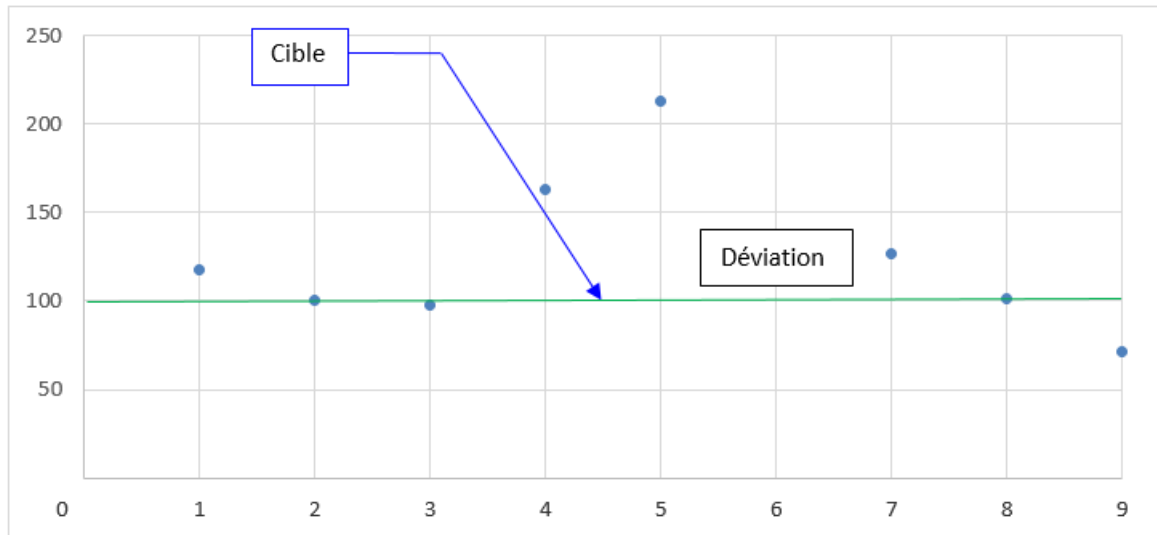


Figure n° 43 – Distribution autour de la cible des recouvrements par échantillon

Mais cet effet est insuffisamment évaluable dans le cadre de ce test. En effet, pour qu'il le soit, il faudrait que chacun des 3 analystes dénombrent les particules sur les mêmes membranes.

Ces 3 valeurs aberrantes sont écartées, ce qui mène à une nouvelle moyenne de 124% avec un écart-type de 45%.

La valeur de 213% peut être expliquée par le fait que des particules peuvent se superposer au-delà d'un certain nombre (11292 particules, dans ce cas) ayant pour impact la sous-évaluation du résultat. Ceci expliquerait que le nombre de particules comptées dans 2000 ml de solvant semble relativement plus bas que le nombre attendu : quatre fois le contenu de 500 ml ($\sim 1465 \times 4$).

La filtration partielle conduit à une surévaluation des résultats évaluée à environ $124 \pm 45 \%$, et présente peu de risque pour le patient.

Il est possible de modifier la méthode de test au profit d'une filtration totale du solvant mais cela la rendrait très chronophage, et pourrait augmenter davantage le risque d'erreurs humaines par l'augmentation du nombre d'opérations de préparation de l'échantillon.

De plus, l'analyse partielle du volume est citée dans la Ph. Eur. dans la méthode 1 de la monographie 2.9.19 où seuls 15 ml sont analysées par blocage de la lumière, même pour les préparations de grand volume > 100 ml.

3.8.4.3 Evaluation du dénombrement partiel de la membrane

Le premier rinçage réalisé dans le cadre de la validation correspond à l'exécution de la méthode de test et est donc considéré pour cette évaluation.

La comparaison est faite entre les résultats, sans distinction de taille, de :

- Dénombrement partiel du volume de 500 ml (à grossissement de 90 fois)
- Dénombrement total du même volume de 500 ml (à grossissement de 20 fois)

Tableau XXXV – Ratio entre le dénombre partiel extrapolé et le dénombrement total (500ml)

Echantillon	Dénombrement partiel	Dénombrement total	Dénombrement partiel extrapolé ¹	Ratio ²
1	274	2017	13152	6.52
2	308	2340	14784	6.32
3	236	1798	11328	6.30
4	305	3122	14640	4.69
5	401	8837	19248	2.18
6	128	988	6144	6.22
7	81	1651	3888	2.35
8	129	1733	6192	3.57
9	89	1860	4272	2.30
10	89	1153	4272	3.71
11	99	1056	4752	4.50
12	100	1465	4800	3.28
			Ratio moyen	4.33

¹ Correspond à la multiplication par 48 du dénombrement partiel

$$^2 \text{ Ratio} = \frac{\text{Dénombrement partiel extrapolé}}{\text{Dénombrement total}}$$

La moyenne du ratio est égale à 4.33 pour un écart-type à 1.43.

Il y a donc relativement plus de particules observées lors du comptage partiel à grossissement de 90 fois que de particules lors du comptage total à un grossissement de 20 fois.

Cela peut être expliqué par le fait que les particules sont plus faciles à distinguer à un grossissement de 90 fois qu'à 20 fois. En effet, il n'y a pas d'hypothèse pouvant expliquer que les particules se concentrent préférentiellement dans les 8 fenêtres analysées.

Le ratio entre ces deux grossissements (90 fois et 20 fois) est de 4.5 et il est approximativement proche du ratio moyen de 4.33.

Titre 4

Discussion Générale

4. Discussion générale

Ce travail s'est focalisé sur l'étude de la méthode de comptage des particules non-visibles par microscopie dans les poches pour perfusion vides, réalisée en trois phases : remplissage par un solvant, filtration sur une membrane puis dénombrement au microscope par l'analyste.

Sa validation présente un cas particulier des validations de méthode analytique pour les deux raisons suivantes :

- Le paramètre analysé est de nature physique, et n'est pas directement concerné par les guidances de l'ICH qui traite plutôt de la validation de méthodes chimiques. Sa validation s'est attaché à étudier les critères de validation les plus impactés par les erreurs inhérentes à ce type de méthode : l'exactitude et la fidélité.
- Aussi, il s'agit plus précisément d'une vérification - des conditions opératoires - car la méthode candidate est du type normalisé, étant établie à partir de trois textes de référence :
 - La norme ISO 8871-3 (2004)
 - La norme ISO 15747 (2012)
 - La monographie 2.9.19 de la Ph. Eur. en vigueur (version 8.2)

1. Evaluation de la conformité de la méthode avec les textes de référence :

Cependant, la méthode présente quelques écarts avec les textes réglementaires. Il est généralement admis de déroger aux références, soit en justifiant son choix dans le dossier de validation, ou lorsque l'impact de la non-conformité est négligeable.

Le tableau suivant reprend les principales déviations, les points qui ne sont pas cités sont considérés conformes :

Tableau XXXVI – Dérogations de la méthode aux textes de références

Etape	Texte	Exigence du texte	Méthode de test
Remplissage des poches	ISO 15747	Remplissage à l'eau exempte de particules	Remplissage à l'eau exempte de particules, additionnée de 0.1% de polysorbate 80 : des données rétrospectives, internes au laboratoire B.Braun, avaient permis d'établir qu'il présente un meilleur taux d'extraction que l'eau seule. L'optimisation de méthode a permis de confirmer que ce solvant est optimal pour l'extraction des particules depuis les poches.
	ISO 8871-3	Remplissage à l'eau exempte de particules sans addition de polysorbate 80 pour l'analyse des particules non visibles par blocage de la lumière, mais avec addition de polysorbate 80 (0.3×10 ⁻³ %) pour l'analyse des particules visibles	

Etape	Texte	Exigence du texte	Méthode de test
Fabrication d'eau exempte de particules	Ph. Eur. (2.9.19)	L'eau exempte de particules est obtenue par filtration de l'eau distillée à travers une membrane de porosité de 0.2 µm.	L'eau exempte de particules est obtenue par filtration à travers une membrane de porosité de 0.2 µm de l'eau purifiée par osmose inverse. Bien que les procédés soient différents, la qualité de cette eau est équivalente au regard de sa contamination particulaire
Principe d'analyse	ISO 15747 et ISO 8871-3	Analyse des particules non visibles par blocage de la lumière	Analyse des particules visibles par microscopie pour harmoniser les méthodes d'analyse de la poche pour perfusion (vide) et la poche de perfusion (remplie)
Filtration	Ph. Eur. (2.9.19)	Filtration de la totalité du volume	Filtration partielle : l'objectif est de réduire le temps d'analyse chronophage. L'impact est évalué lors de la validation et conduit à une surévaluation du résultat (faible risque pour le patient). De plus, l'analyse partielle du volume est citée dans la Ph. Eur. dans la méthode 1 de la monographie 2.9.19 où seuls 15 ml sont analysés par blocage de la lumière, même pour les préparations de grand volume > 100 ml.
Détermination de taille	Ph. Eur. (2.9.19)	Transformation mentale de l'image de chaque particule en un cercle et comparaison aux cercles de référence	Utilisation d'un logiciel qui détermine la surface de chaque particule de manière précise selon la formule suivante : $\text{diamètre équivalent} = 2 \times \sqrt{\frac{\text{Aire de la particule mesurée}}{\pi}}$

2. Etapes de la validation :

Basée sur la cartographie de la méthode, l'analyse de risque a permis d'identifier les sources potentielles d'erreurs, de les classer selon l'outil du 5M et de les hiérarchiser pour mettre en évidence ceux qui influencent le résultat, à savoir :

- le facteur humain
- la capacité du solvant de rinçage à extraire les particules
- la contamination secondaire par l'environnement d'analyse.

Par la suite, l'optimisation de méthode s'est attachée à réduire le risque en formulant des recommandations d'amélioration continue et une optimisation de l'extraction des particules afin de valider une méthode complètement mise au point.

En se basant sur ces éléments, les efforts de validation s'attachent particulièrement à l'élimination des risques d'erreurs en étudiant les critères qui s'y rapportent :

Exactitude	solvant de remplissage
Répétabilité	préparation de l'échantillon
Précision intermédiaire	facteur humain

Les étapes préliminaires à la validation ont permis également de poser les bases de la validation en choisissant un standard interne, en définissant une méthode interne pour sa quantification ainsi que des critères d'acceptation pour le critère d'exactitude :

- Le standard de particules constitué de poussière de film en polyoléfine répond à la définition donnée par l'ICH car il est caractérisé et évalué par des procédures additionnelles (incluant 4 extractions successives) autre que celles utilisées en routine (incluant une extraction unique).
- Le critère d'acceptation de l'exactitude est fixé à $\geq 75\%$, largement suffisant, permet d'analyser une majeure partie de la contamination effective, et surtout la partie susceptible d'être transférée au patient pendant l'administration médicale.

3. Critères de validation :

Cependant des critères supplémentaires auraient pu être étudiés, notamment la linéarité, l'intervalle de validité :

- La linéarité aurait pu démontrer la capacité à obtenir des résultats proportionnels à la quantité de particules effectivement présente. Mais les tests auraient certainement été difficiles à conduire en raison des risques inhérents de sous-évaluation ou surévaluation du résultat, qui peuvent ainsi altérer la linéarité.
- L'intervalle de validité aurait pu démontrer un bon niveau de fidélité, exactitude et linéarité entre le plus bas et le haut résultat.

Dans le cas de la contamination particulière, le plus bas résultat est égal à zéro et correspond à une membrane filtrante complètement exempte de particules.

Tout analyste correctement formé à la microscopie optique est sensé pouvoir reconnaître une membrane totalement vide. La difficulté réside dans la préparation de l'échantillon pour l'obtention d'un tel résultat et nécessiterait certainement plusieurs tentatives.

L'étude de ces critères supplémentaire demanderait donc un investissement important en termes de temps et de ressources. Qu'est-ce qui peut justifier la réalisation d'un nombre important de tests ? Et quelle serait leur valeur ajoutée au produit pharmaceutique ? Un objectif de 100% d'assurance de fiabilité de la méthode n'est pas requis et certainement difficilement atteignable.

De manière générale, ce travail propose une approche rationnelle et objective pour la validation du dénombrement des particules non visibles dans les poches pour perfusion, avec un objectif global, celui d'assurer la sécurité du patient et l'efficacité du médicament. L'étude des critères d'exactitude, de répétabilité et de précision intermédiaire ont prouvé la fiabilité de la méthode et son adéquation avec l'évaluation de la qualité des médicaments de manière suffisante.

Cependant, en raison de ses nombreux paramètres afférents, l'incertitude et les erreurs expérimentales indissociables avec les méthodes physiques, ceux-ci doivent être considérés pour toute évaluation supplémentaire.

4.1 Perspectives :

Ce travail ouvre différentes perspectives dans le domaine des particules dans les médicaments destinés à la voie parentérale.

- D'abord, au regard de la validation de méthode, il apparaît naturel de poursuivre le cycle de vie de la méthode, par l'évaluation périodique, la maintenance et la maîtrise des changements. Ces points sont déjà prévus dans les procédures internes du laboratoire B.Braun.
- Pour la méthode de test à B.Braun, l'étude du facteur analyste-dépendant peut être investiguée en faisant réaliser des dénombrements au microscope des mêmes membranes par plusieurs analystes pour expliquer les écarts, et compléter leur qualification à cette opération.
- Il est également possible d'envisager de revalider cette méthode moyennant une autre approche, un autre standard, ou en étudiant des critères de validation supplémentaires si cela est jugé pertinent par l'analyste.
- Pour les autres types de poches qui sont nouvellement produites sur d'autres machines, avec une conception et des matériaux différents, il convient d'évaluer l'applicabilité de la validation de méthode réalisée sur ces poches, ou de la valider de nouveau si nécessaire.
- Sur le plan toxicologique, et bien que le sujet des particules injectées fasse souvent l'actualité dans le monde de la santé, l'impact sur la santé humaine reste insuffisamment documenté. Il serait intéressant de réaliser une revue bibliographique critique des cas publiés dans la littérature scientifique.

Titre 5

Conclusion

5. Conclusion

THESE SOUTENUE PAR : Wafa El-Hadeuf

TITRE :

Les particules dans les médicaments à usage parentéral Cas pratique d'une validation de méthode

CONCLUSION :

Ce travail s'est focalisé sur la méthodologie physique de comptage des particules non visibles dans les médicaments destinés à la voie parentérale. Il propose une approche rationnelle de validation basée sur le profil d'exactitude, dans un objectif global et unique : assurer la sécurité et la santé du patient.

Les méthodes physiques induisant automatiquement des erreurs, une analyse de risque est réalisée dans un premier temps pour identifier les facteurs d'erreur et les hiérarchiser selon leur impact sur le résultat. Les facteurs dont l'impact est jugé important sont ciblés par la gestion du risque afin de réduire cet impact à un niveau acceptable, moyennant deux approches : l'optimisation pour les facteurs dont l'impact est quantifiable, et l'amélioration continue pour les autres.

Dans un second temps, la validation de méthode s'est concentrée sur les critères qui sont étroitement liés aux facteurs d'erreur les plus importants : la justesse et la fidélité des résultats. Leur étude a fourni des données qui prouvent que la méthode permet une maîtrise rationnelle du risque d'erreur et une évaluation adéquate de l'impact des médicaments à usage parentéral sur la santé du patient.

De manière générale, ce travail apporte une plus-value à l'ensemble des acteurs de santé grâce à l'étude 'à la loupe' de ce paramètre pertinent que constituent les particules dans les médicaments à usage parentéral. La validation de méthode est documentée selon les GMP et standards du groupe B.Braun dans des rapports pouvant être présentés lors d'un audit. Ces rapports apportent la preuve de la qualité des médicaments produits quotidiennement et perfusés à des millions de patients à travers le monde.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 7/11/2014

LE DOYEN



Pr. Christophe RIBUOT

LE PRESIDENT DE LA THESE

Signature and stamp of the President of the Thesis (UFR de Pharmacie, Université Joseph Fourier, Grenoble 1, Pr. D. WOUESSIDJEW)

Bibliographie

- [1] B.Braun Medical AG : www.bbraun.com
- [2] Pharmacopée Européenne. 2014. Version 8.2. « Contamination particulaire : particules non visibles » (chapitre 2.9.19). Strasbourg.
- [3] Collectif. 2009. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6^{ème} Ed. Londres. *Pharmaceutical Press & American Pharmacists Association*, p. 549-553
- [4] Moulin M. ; Coquerel A. 2002. « Voie d'administration des médicaments » (chap. 7). *Pharmacologie, connaissances et pratique*. 2^{ème} Ed. Paris : Masson, p. 37-40
- [5] Le Petit Larousse Illustré. Paris : 2013
- [6] Pharmacopée Européenne. 2014. Version 8.2. « Préparation parentérale » (monographie 0520). Strasbourg.
- [7] Pharmacopée Européenne. 2014. Version 8.2. « Récipients » (monographie 30201, chapitre 3.2). Strasbourg.
- [8] Pharmacopée Européenne. 2014. Version 8.2. « Récipients en plastique pour préparation parentérale » (monographie 90003, chapitre 3.2.2.1). Strasbourg.
- [9] Chatain M. 1993. « Comportements physique et thermomécanique des plastiques ». Paris : Ed. Techniques de l'ingénieur, p. 28-29
- [10] Etats-Unis, *Food and Drugs Administration (FDA)*. 2014. « *Drug product containers and closures* » (21 CFR 211.94(a)). *Current Good Manufacturing Practice For Finished Pharmaceuticals. Title 21 of the Code of Federal Regulations*. Téléchargeable sur : <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=211.94>
- [11] *International Organization for Standardization ISO*. 2010. « Récipients en plastique pour injections intraveineuse ». NF EN ISO 15747. La Plaine Saint-Denis : Association Française de Normalisation (AFNOR), p. 1-7
- [12] Widmaier E. P. ; Raff H. ; Strang K. T. 2013. « Physiologie cardiovasculaire » (chap. 12). *Physiologie humaine*. 6^e Ed. Canada : Maloine, p. 354-356, 385
- [13] Pearson Education Ad. Française Moussakova L. ; Lachaîne R. 2010. « Le système cardiovasculaire : les vaisseaux sanguins » (chap. 19). *Physiologie humaine*. 6^e Ed. Paris : ERPI, p. 804
- [14] European Compliance Academy (ECA) a été fondée le 1^{er} Janvier 1999 en tant qu'association indépendante et est aujourd'hui leader européen dans le domaine de l'assurance qualité pharmaceutique : http://www.gmp-compliance.org/eseinar_8398_Particles-in-Parenterals--and-beyond-.html
- [15] A3P, Association pour les produits propres et stériles, est un acteur majeur du secteur de l'industrie pharmaceutique et biotechnologique au service de plus de 1000 adhérents, fournisseurs et fabricants : <http://www.a3p.org>
- [16] *European Organization for Quality Control, Section for Quality Control in Pharmaceutical and Cosmetic Industries*. 1985. « *Visible and Subvisible Particles in Parenteral Products – Brussels, Belgium – October 1985* ». Berne: *The European Organization for Quality Control (EOQC)*, 279 p.

- [17] *Particles In Parenterals*. 2013. [Conférence de l'ECA]. (Conférence : Vienne (Autriche), 2 jours du 7 au 8 Mai 2013). Heidelberg: ECA.
- [18] Barber T. A. 2000. *Control of Particulate Matter Contamination in Healthcare Manufacturing*. Floride : Taylor & Francis Group LLC, p. 2-9, 12, 18, 28-29, 36, 56-57, 277, 373-375, 402, 415-417, 428, 431, 452.
- [19] Collectif. 2006. *Particle toxicology*. Floride : Taylor & Francis Group LLC, 442 p.
- [20] Langille S. E. 2013. « *Particulates in Injections : A Regulatory Perspective* ». *Particles In Parenterals*. [Conférence de l'ECA]. (Conférence : Vienne (Autriche), 2 jours du 7 au 8 Mai 2013). Heidelberg: ECA
- [21] *Food And Drug Administration*: www.fda.org
- [22] Renger B. 2013. « *Sources of Particulate Matter in Injectables* ». *Particles In Parenterals*. [Conférence de l'ECA]. (Conférence : Vienne (Autriche), 2 jours du 7 au 8 Mai 2013). Heidelberg : ECA
- [23] Yakugaku Z. et al. (2006). *Usefulness of the final filter of the IV infusion set in intravenous administration of drugs contamination of injection preparations by insoluble microparticles and its causes*. Résumé téléchargeable sur : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16596019>
- [24] Jack. T. et al. (2012). *In-line filtration reduces severe complications and length of stay on pediatric intensive care unit: a prospective, randomized, controlled trial*. Résumé téléchargeable sur : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22527062>
- [25] Aldrich S. 2010. « *Parenterals USP General Chapters <788>/<789>* ». *USP Workshop on Particle Size : Particle Detection & Measurement. Day 2*. [Séminaire de l'USP]. (Séminaire : Rockville (Etats-Unis), 3 jours du 8 au 10 Décembre 2010)
- [26] Mulkerrin M. (2010). « *Industry Perspectives for Solutions* ». *Day 1*. [Séminaire de l'USP]. (Séminaire : Rockville (Etats-Unis), 3 jours du 8 au 10 Décembre 2010). Téléchargeable sur : http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/meetings/workshops/0120101208psawsday1master.pdf
- [27] *International Organization for Standardization ISO*. 2004. « *Dénombrement des particules libérées* » (partie 3). Elements en élastomères pour administration parentérale et dispositifs à usage pharmaceutique. NF EN ISO 8871-3. La Plaine Saint-Denis : Association Française de Normalisation (AFNOR)
- [28] *International Conference on Harmonization (ICH)*. 2007. « *Evaluation and Recommendation of Pharmaceutical Texts for Use in the ICH Regions* » (Chap. Q4B). Genève : ICH. p. 4-6, 9-10
- [29] Pharmacopée Européenne. 2014. Version 8.2. « *Réactifs* » (chap. 4.1.1). Strasbourg.
- [30] Carlton R. A. (2011). *Pharmaceutical Microscopy*. New York: Springer Science Business Media LLC, p. 196, 247, 264-266, 416
- [31] Meury R. 2010. « *Particle Size Fundamentals* ». *USP Workshop on Particle Size: Particle Detection & Measurement. Day 1*. [Séminaire de l'USP]. (Séminaire : Rockville (Etats-Unis), 3 jours du 8 au 10 Décembre 2010). Téléchargeable sur : http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/meetings/workshops/0120101208psawsday1master.pdf

- [32] Amarouche S. 2010. « Caractérisation d'une méthode de mesure : étape clé dans le processus de validation ». Paris : Ed. Techniques de l'ingénieur, p.2-5
- [33] *International Conference on Harmonization (ICH)*. 2005. « *Quality Risk Management* » (Chap. Q9). Genève : ICH, p. 2-11
- [34] Feinberg M. 2012. « Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude ». Paris : Ed. Techniques de l'ingénieur, p. 2-8
- [35] *International Organization for Standardization ISO*. 2005. « Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ». NF EN ISO 17025. La Plaine Saint-Denis : Association Française de Normalisation (AFNOR), p.15
- [36] *International Conference on Harmonization (ICH)*. (2005). « *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* » (Chap. Q2 (R1)). Genève: ICH.
- [37] Etats-Unis, *Food and Drugs Administration*. 2014. « Laboratory Records » (21 CFR 211.194 (a)(2)). Current Good Manufacturing Practice For Finished Pharmaceuticals. *Title 21 of the Code of Federal Regulations*. Téléchargeable sur:
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=211.194>
- [38] *The United State Pharmacopoeia*. 2008. « *Validation of compendial procedures* » (chap. <1225>)
- [39] *International Conference on Harmonization (ICH)*. 2000. « *Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances* » (Chap. Q6A). Genève: ICH, p.7
- [40] Brochure du laboratoire B.Braun Medical AG : manipulation de Nutiflex® (thérapie parentérale)
<http://www.safeinfusiontherapy.com/cps/rde/xchg/hc-safeinfusion-en-int/hs.xsl/17036.html>,
dernière consultation le 20/8/2014.
- [41] BBraun Medical AG. Melsungen. Procédure DIV-202.

Outils logiciels

Minitab 16 : application informatique pour l'optimisation des processus, des produits et services

Normes et standards

Normes ISO

ISO 8871-3	2004	Éléments en élastomères pour administration parentérale et dispositifs à usage pharmaceutique. Partie 3 : Dénombrement des particules libérées
ISO 15747	2010	Récipients en plastique pour injections intraveineuse
ISO 17025	2005	Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais
ISO 14644-1	1999	Salles propres et environnements maîtrisés apparentés. Partie 1 : Classification de la propreté de l'air

Standards de la Ph. Eur. Version 8.2 en vigueur

Chapitre 2.9.19	Contamination particulaire : particules non visibles
Chapitre 3.2	Récipients
Chapitre 3.2.2.1	Récipients en plastique pour préparation parentérale
Chapitre 4.1.1	Réactifs
Monographie 0520	Préparations parentérales

Lignes Directrices de l'ICH « International Conference on Harmonization »

ICH (Q4B)	<i>Evaluation and Recommendation of Pharmaceutical Texts for Use in the ICH Regions</i>
ICH (Q9)	<i>Quality Risk Management</i>
ICH (Q2 (R1))	<i>Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology</i>
ICH (Q6A)	<i>Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances</i>

Autres références réglementaires : cGMP (2014)

21 CFR 211.94 (a)	<i>Drug product containers and closures</i>
21 CFR 211.194 (a)(2)	<i>Laboratory Records</i>

Annexes

Annexe 01 : Motifs et détails des retraits de lots publiés sur le site de la FDA de Janvier 2013 à Septembre 2014.

Source : <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/DrugRecalls/default.htm>

Entreprise	Date	Produit	Nombres de lots	Particules		Autre
				Visible	Non visible	
Baxter	16.09.14	Chlorure de potassium	1			Erreur d'étiquetage
Hospira	11.09.14	Heparine [®]	1	X		
Pharmacy Creations	06.09.14	Produits stériles	4			Assurance de stérilité
Martin Avenue Pharmacy, Inc.	27.08.14	Produits stériles	Non précisé			Assurance de stérilité
Baxter	14.08.14	Dianeal [®]	2	X		
Amgen	13.08.14	Aranesp [®]	9	X		
Cubist Pharmaceuticals	08.08.14	Cubicin [®]	9		X	
Cubist Pharmaceuticals	06.08.14	Cubicin [®]	98		X	
Hospira	29.07.14	Lidocaine	1	X		
American Health Packaging	21.07.14	Oxcarbazepine	Non précisé			Autre
Baxter	14.07.14	Solutions IV	4	X		
Hospira	10.07.14	Ringer et 5% Dextrose Inj.	1			Assurance stérilité
BMS	30.06.14	Coumadine [®]	6	X		
Hospira	17.06.14	0.5% Marcaine [®]		X		
Alexion	02.06.14	Soliris [®]	1	X		
Fresenius Medical Care	21.05.14	NaturaLyte [®] Liquid Bicarbonate	56			Assurance stérilité
Hospira	16.05.14	Labetalol Hydrochloride Inj.	Non précisé	X		
Hospira	14.05.14	Dobutamine [®]	1	X		
Hospira	21.04.14	Marcaine [®]	1	X		
Hospira	18.04.14	Lidocaine 1%	1	X		
Cubist Pharmaceuticals	18.04.14	Cubicin [®]	1	X		
Hospira	17.04.14	Propofol [®]	7	X		
Shire Pharmaceuticals	14.03.14	VPRIV [®]	3	X		

Entreprise	Date	Produit	Nombres de lots	Particules		Autre
				Visible	Non visible	
Woodland Park	12.03.14	Reumofan Plus	1			Ingrédient non déclaré
Pfizer	06.03.14	Effexor®, Venlafaxine®	3			Erreur d'étiquetage
Baxter	05.03.14	Dianeal®	1	X		
Ben Venue Laboratories	14.02.14	Acetyl-cysteine Sol 10% pour inhalation	Non précisé	X		
MyNicKnaxs, LLC	04.02.14	Pilules de réduction de poids	Non précisé			Ingrédient non déclaré
The Mentholatum Company	16.01.14	Rohto®	Non précisé			Assurance stérilité
Baxter	23.12.13	5% Dextrose Injection, USP	5		X	
Hospira	23.12.13	Lidocaine HCl inj. 2%	1		X	
Abrams Royal Pharmacy	18.12.13	Plusieurs	Non précisé			Assurance stérilité
Alexion	13.12.13	Soliris® IV	2	X		
Baxter	27.11.13	Nitroglycérine 5% Dextrose Inj.	1	X		
Nature's pharmacy	13.11.13	Plusieurs	Non précisé			Assurance de stérilité
Perrigo	01.11.13	Acetaminophen Infant	18			Autre
Hospira	18.10.13	Marcaine 0,25%®	1	X		
B.Braun Medical	15.10.13	Cefepime 1g	Non précisé	X		
Nephron Pharmaceuticals	10.10.13	Albuterol Sulfate 0.083%®	10			Autre
Hospira	04.10.13	Lidocaine HCl inj. 1%	1	X		
Hospira	01.10.13	Metoclopramide Inj	3	X		
Hospira	13.09.13	Bupivacaine®	2	X		
Leiter's Pharmacy	10.09.13	Bevacizumab	3			Assurance de stérilité
Park Compounding	10.09.13	Testosterone Cypionate	1			Assurance de stérilité

Entreprise	Date	Produit	Nombres de lots	Particules		Autre
				Visible	Non visible	
Avella Specialty Pharmacy	09.09.13	Bevacizumab et Vancomycin	2			Assurance de stérilité
McNeil Consumer Healthcare	06.09.13	MOTRIN [®] Infants Drops	3	X		
University Compounding Pharmacy	06.09.13	Testosterone et PGE-1NS	7			Assurance de stérilité
Altaire Pharmaceuticals, Inc.	06.09.13	Carboxymethyl cellulose Sodium 0.5% Ophthalmic	9			Conservation
Medaus Pharmacy	04.09.13	Plusieurs	10			Assurance de stérilité
Cubist Pharmaceuticals	29.08.13	Cubicin [®] Inj	4	X		
JCB Laboratories	27.08.13	Plusieurs	6			Assurance de stérilité
Wellness Pharmacy	26.08.13	Plusieurs	6			Assurance de stérilité
Park Pharmacy	23.08.13	Plusieurs inj	2			Assurance de stérilité
Aidapak Services LLC	17.08.13	Plusieurs oraux	Non précisé			Erreur d'étiquetage
Specialty Compounding	09.08.13	Plusieurs inj	Non précisé			Assurance de stérilité
Nexus Pharmaceuticals Inc.	01.08.13	Benzotropine Mesylate Injection	1	X		
Beacon Hill Pharmacy	31.07.13	Plusieurs	Non précisé			Assurance de stérilité
Sandoz US	03.07.13	Estarlyla [®] oral	1			Autre
Fresenius Kabi	30.06.13	Benzotropine Mesylate Injection	4	X	X	
Advance Pharmaceutical Inc.	19.06.13	Enteric coated Aspirin Tablets	1			Erreur d'étiquetage
Sagent Pharmaceuticals	13.06.13	Vecuronium Bromide for Injection	18			Conservation
Zydus Pharmaceutical USA Inc.	10.06.13	Warfarin comp.	1			Autre

Entreprise	Date	Produit	Nombres de lots	Particules		Autre
				Visible	Non visible	
Sagent Pharmaceuticals	07.06.13	Vecuronium Bromide for Injection	3			Conservation
Lowlite Investments, Inc.	29.05.13	Plusieurs	Non précisé			Assurance de stérilité
Main Street Family Pharmacy, LLC	28.05.13	Plusieurs	Non précisé			Assurance de stérilité
Fresenius Kabi	25.05.13	Magnesium Sulfate	1	X		
Sandoz US	20.03.13	Methotrexate Sodium USP	2	X		
Pentec Health	15.05.13	Plusieurs	Non précisé			Assurance de stérilité
Hospira	10.05.13	Piperacillin et Tazobactam	21	X		
Compounding Shop, LLC	06.05.13	Plusieurs	Non précisé			Assurance de stérilité
Hospira	26.04.13	Piperacillin et Tazobactam	15	X		
Hospira	26.04.13	Chlorure de sodium 0.9%	Non précisé	X		
Nora Apothecary	22.04.13	Plusieurs	Non précisé			Assurance de stérilité
Balanced Solutions Products	17.04.13	Plusieurs	Non précisé			Assurance de stérilité
Apothecure, Inc	15.04.13	Plusieurs	Non précisé			Assurance de stérilité
NuVision Pharmacy	15.04.13	Produits lyophilisés	Non précisé			Assurance de stérilité
Green Valley Drugs	05.04.13	Plusieurs	Non précisé			Assurance de stérilité
Hospira	29.03.13	Chlorure de sodium 0.9%	1	X		
Pallimed Solutions, Inc.	26.03.13	Plusieurs	Non précisé	X		
Medprep Consulting Inc.	20.03.13	Plusieurs	Non précisé			Assurance de stérilité
Clinical Specialties Pharmacy	20.03.13	Plusieurs	Non précisé			Assurance de stérilité
Clinical Specialties	18.03.13	Avastin seringues préremplies	40			Assurance de stérilité

Entreprise	Date	Produit	Nombres de lots	Particules		Autre
Medprep Consulting Inc.	17.03.13	Plusieurs	Non précisé			Assurance de stérilité
Medprep Consulting Inc.	16.03.13	Sulfate de magnésium 2mg	Non précisé			Assurance de stérilité
Affymax & Takeda	23.02.13	Omontys®	5			Autre
Reumofan Plus USA, LLC	15.02.13	Reumofan Plus	Non précisé			Ingrédient non déclaré
Gilead	15.02.23	Vistide®	1	X		
Advance Pharmaceutical	17.01.13	Sufate ferreux 325 mg	1			Ingrédient non déclaré
Mobius Therapeutics, LLC	10.01.13	Mitosol® 0.2 mg/dose ophtalmique	2			Assurance de stérilité

Calculs :

Motif	Nombre de rappels de lot	Pourcentage
Présence de particules	40	44,9%
Assurance de stérilité	32	36,0%
Erreur d'étiquetage	4	4,5%
Ingrédient non déclaré	4	4,5%
Autre	9	10,1%
Total	89	-

Annexe 02 : Classes types de propreté particulaire de l'air des salles propres et zones propres (selon la norme ISO 14644-1)

Le tableau suivant présente des classes types de propreté particulaire et les concentrations correspondantes des particules de tailles égales ou supérieures aux valeurs considérées.

Tableau 1 — Classes types de propreté particulaire de l'air des salles propres et zones propres

Numéro de classification ISO (N)	Concentrations maximales admissibles (particules/m ³ d'air) en particules de taille égale ou supérieure à celle donnée ci-dessous					
	0,1 µm	0,2 µm	0,3 µm	0,5 µm	1 µm	5 µm
Classe ISO 1	10	2				
Classe ISO 2	100	24	10	4		
Classe ISO 3	1 000	237	102	35	8	
Classe ISO 4	10 000	2 370	1 020	352	83	
Classe ISO 5	100 000	23 700	10 200	3 520	832	29
Classe ISO 6	1 000 000	237 000	102 000	35 200	8 320	293
Classe ISO 7				352 000	83 200	2 930
Classe ISO 8				3 520 000	832 000	29 300
Classe ISO 9				35 200 000	8 320 000	293 000

NOTE À cause des incertitudes dues au mesurage, les concentrations sont données avec, au plus, 3 chiffres significatifs.

Annexe 03 : Standard *Duke Standard Microspheres Size NIST* de polystyrène et calculs du nombre de particules :

	Standard de 10 µm	Standard de 25 µm
Produit	4210A	4225A
N° de lot	41863	40804
Taille certifiée (µm)	10.00 ± 0.08	24.61 ± 0.22
Volume (ml)	15	15
Concentration solide (%)	0.23	0.5
Nombre de particules ¹	65 × 10 ⁶	8.5 × 10 ⁶

$$^1 \text{ Nombre de particules} = \frac{\text{Volume total des particules}}{\text{Volume d'une particule}}$$

$$\text{Où : } \text{Volume total des particules} = \frac{\text{volume du flacon} \times \text{concentration solide (v/v)}}{100}$$

$$\text{Volume d'une particule} = \frac{4}{3} \pi r^3$$

Pour rappel : 1 ml = 1 cm³

$$1 \mu\text{m}^3 = 10^{-12} \text{ cm}^3$$

1. Calcul du nombre de particules de 10 µm :

$$\text{Volume total des particules (cm}^3\text{)} = \frac{15 \times 0.23}{100}$$

$$\text{Volume d'une particule (cm}^3\text{)} = \frac{4}{3} \pi (5)^3 \times 10^{-12}$$

$$\text{Nombre de particules} \sim 65 \times 10^6$$

2. Calcul du nombre de particules de 25 µm :

$$\text{Volume total des particules (cm}^3\text{)} = \frac{15 \times 0.5}{100}$$

$$\text{Volume d'une particule (cm}^3\text{)} = \frac{4}{3} \pi (12.5)^3 \times 10^{-12}$$

$$\text{Nombre de particules} \sim 8.5 \times 10^6$$

Annexe 04 : Calculs des dilutions et prélèvements du standard de microsphères de polystyrène

Un volume de 100 µl de standard de particules est prélevé à l'aide d'une micropipette puis dilué au 1/1000^e. Un volume de 1 ml est prélevé à l'aide d'une pipette.

Volume du standard	Nombres de particules contenues	
	Standard de 10 µm	Standard de 25 µm
15 ml (flacon d'origine)	65×10^6	8.5×10^6
100 µl (volume pipeté) ¹	433 333	56 667
1 ml (après dilution au 1/1000 ^e) ²	433	57

¹ Nombre dans 100 µl = $65 \times 10^6 \times 100 / 15 \times 10^5$

² Après dilution au 1/1000^e, 433 333 de particules sont dispersées dans 1000 ml, ce qui aboutit à une concentration de 433 particules/ml.

Annexe 05 : Données brutes de comptage de particules des 10 opérations d'extractions avec distinction de taille (développement d'une méthode de quantification du standard interne)

N° d'extraction	Poche 1		Poche 2		Poche 3	
	≥ 10 µm	≥ 25 µm	≥ 10 µm	≥ 25 µm	≥ 10 µm	≥ 25 µm
1	244	366	89	354	119	268
2	126	31	117	121	27	31
3	136	39	48	48	5	13
4	21	25	9	14	7	14
5	46	17	11	26	4	13
6	0	20	5	14	25	9
7	173	65	161	96	21	18
8	59	59	46	109	18	17
9	0	17	17	44	11	17
10	0	19	12	36	4	21

Annexe 06 : Données brutes d'optimisation de méthode

Condition de test n°	Extraction 1			Extraction 2			Extraction 3			Extraction 4		
	≥ 10 µm	≥ 25 µm	Total	≥ 10 µm	≥ 25 µm	Total	≥ 10 µm	≥ 25 µm	Total	≥ 10 µm	≥ 25 µm	Total
1	1147	2304	3451	121	312	433	21	77	98	33	33	66
	1171	2741	3912	75	128	203	119	289	408	65	136	201
	854	3282	4136	52	110	162	26	70	96	31	92	123
	670	2170	2840	66	195	261	8	19	27	61	69	130
	585	1789	2374	85	223	308	20	48	68	32	65	97
2	632	2127	2759	46	130	176	57	122	179	51	32	83
	494	2366	2860	48	162	210	67	154	221	36	55	91
	906	3876	4782	29	89	118	72	176	248	19	1	20
	539	1767	2306	58	114	172	53	99	152	15	15	30
	1252	2231	3483	50	182	232	52	185	237	27	22	49
3	1151	3633	4784	15	46	61	24	68	92	57	86	143
	1059	4455	5514	63	209	272	34	86	120	41	165	206
	992	4135	5127	37	191	228	23	70	93	87	165	252
	923	4033	4956	158	295	457	27	49	76	63	24	87
	330	1009	1339	36	140	176	73	167	240	30	47	77
4	2079	3055	5134	269	380	649	82	189	271	43	82	125
	2528	3032	5560	154	423	577	67	143	210	10	30	40
	1014	1820	2834	108	242	350	39	86	125	18	62	80
	900	4148	5048	83	243	326	93	223	316	37	85	122
	1790	3928	5718	126	360	486	37	97	134	57	68	125

Annexe 07 : Protocole de calcul du volume de standard interne à injecter aux poches pour perfusion vide pour la validation de méthode

Protocole de test :

- Prélever 1 ml de la suspension de standard interne
- Filtrer ce volume sur une membrane filtrante de porosité 0.45 µm
- Dénombrer les particules contenues sur la totalité de la membrane filtrante avec distinction de taille (≥ 10 µm et ≥ 25 µm)
- Répéter l'opération 3 fois

Calcul :

Le volume de standard est déterminé de manière à augmenter la contamination particulaire des poches pour perfusion à une valeur atteignant les limites compendiales (ou au moins 40%), selon la formules suivantes :

1. Volume nécessaire pour atteindre les spécifications des particules ≥ 10 µm

$$\text{Volume } 10 = \text{Total } 10 / \text{Partiel } 10$$

Où :
 Volume 10 = volume du standard de référence à injecter, tenant compte des particules ≥ 10 µm
 Partiel 10 = nombre de particules ≥ 10 µm contenues dans 1 ml
 Total 10 = nombre total des particules ≥ 10 devant être injectées (limites compendiales × volume nominal des poches pour perfusion)

2. Volume nécessaire pour atteindre les spécifications des particules ≥ 25 µm

$$\text{Volume } 25 = \text{Total } 25 / \text{Partiel } 25$$

Où :
 Volume 25 = volume du standard de référence à injecter, tenant compte des particules ≥ 25 µm
 Partiel 25 = nombre de particules ≥ 25 µm contenues dans 1 ml
 Total 25 = nombre total des particules ≥ 25 devant être injectées (limites compendiales × volume nominal des poches pour perfusion)

Si « volume 10 » et « volume 25 » ne sont pas égaux, considérer le volume le plus grand.

Résultats :

Test	Dénombrement (particules/ml)	
	Particules ≥ 10 µm/ml	Particules ≥ 25 µm/ml
1	4672	6439
2	5249	7127
3	4288	7853
Moyenne (p/ml)	4736	7140
Spécifications (p/ml)	12 × 2500	2 × 2500
Volume d'injection (ml)	6.3	7

Annexe 08 : Données brutes des résultats de la validation

1. Filtration du volume de 500 ml

Echantillon N°	Extraction 1					Extraction 2						
	Préparation ¹	Comptage intégral	Comptage partiel	≥ 10 µm ⁽²⁾	≥ 25 µm	Comptage ³	Préparation	Comptage intégral	Comptage partiel	≥ 10 µm	≥ 25 µm	Comptage
1	Analyste 1	2017	274	120	154	Analyste 1	Analyste 1	123	0	0	0	Analyste 2
2		2340	308	133	175			55	0	0	0	
3		1798	236	88	148			25	0	0	0	
4		3122	305	113	192			135	2	1	1	
5		8837	401	204	197			126	1	0	1	
6 ⁽⁴⁾		988	128	48	80			112	6	0	6	
7	Analyste 2	1651	81	47	34	37		1	0	1		
8		1733	129	55	74	50		1	0	1		
9		1860	89	39	50	79		0	0	0		
10	Analyste 3	1153	89	34	55	128		3	0	3		
11		1056	99	32	67	33		0	0	0		
12		1465	100	45	55	85		1	0	1		

¹ Analyste ayant réalisé la préparation de l'échantillon (remplissage et filtration)

² Correspond à une taille comprise entre 10 et 25 µm

³ Analyste ayant réalisé le comptage des particules au microscope optique

⁴ Déviation : le dénombrement est issu d'une division par un facteur 5 du résultat du comptage après filtration de 2500 ml au lieu de 500 ml

Echantillon N°	Extraction 3					Extraction 4						
	Préparation	Comptage intégral	Comptage partiel	≥ 10 µm	≥ 25 µm	Comptage	Préparation	Comptage intégral	Comptage partiel	≥ 10 µm	≥ 25 µm	Comptage
1	Analyste 1	43	0	0	0	Analyste 2	Analyste 1	11	0	0	0	Analyste 2
2		27	0	0	0			46	0	0	0	
3		52	2	0	2			35	0	0	0	
4		84	2	1	1			24	0	0	0	
5		74	2	0	2			12	0	0	0	
6		42	0	0	0			16	0	0	0	
7		26	0	0	0			10	0	0	0	
8		10	0	0	0			30	1	0	1	
9		27	0	0	0			9	0	0	0	
10		5	0	0	0			4	0	0	0	
11		5	0	0	0			8	0	0	0	
12		10	0	0	0			20	0	0	0	

2. Filtration du volume résiduel de 2000 ml

Echantillon N°	Extraction 1					Comptage
	Préparation	Comptage intégral	Comptage partiel	≥ 10 µm	≥ 25 µm	
1	Analyste 1	6495	625	694	6495	Analyste 1
2		9384	260	493	9384	
3		7346	416	520	7346	
4		6482	484	783	6482	
5		11929	579	964	11929	
6		-	-	-	-	
7	Analyste 2	4866	546	599	4866	Analyste 2
8		6805	432	646	6805	
9		11220	480	661	11220	
10	Analyste 3	9248	404	697	9248	Analyste 3
11		7853	364	536	7853	
12		11592	404	729	11592	

Le serment des apothicaires



Serment des Apothicaires



Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

THESE SOUTENUE PAR : Wafa El-Hadeuf

TITRE :

**LES PARTICULES DANS LES MEDICAMENTS DESTINES A L'USAGE PARENTERAL
CAS PRATIQUE D'UNE VALIDATION DE METHODE**

Résumé

La thérapie parentérale est une pratique incontournable, mais la présence de particules peut avoir un impact médical grave qui préoccupe actuellement les cliniciens et les industries de santé.

Ce travail s'est focalisé sur l'étude de la méthode physique de quantification des particules non visibles dans les médicaments destinés à la voie parentérale. Il propose une approche rationnelle de validation basée sur le profil d'exactitude, dans l'objectif global d'assurer la sécurité du patient.

Les méthodes physiques induisant automatiquement des erreurs, une analyse de risque est réalisée dans un premier temps pour identifier les facteurs d'erreur et les hiérarchiser selon leur impact sur le résultat. Les facteurs dont l'impact est jugé important sont ciblés par la gestion du risque afin de réduire cet impact à un niveau acceptable, moyennant deux approches : l'optimisation pour les facteurs dont l'impact est quantifiable, et l'amélioration continue pour les autres.

Dans un second temps, la validation de méthode s'est concentré sur les critères qui sont étroitement liés aux facteurs d'erreur les plus importants : la justesse et la fidélité des résultats. Leur étude apporte les preuves que la méthode permet une maîtrise rationnelle du risque d'erreur et une évaluation adéquate de l'impact des médicaments sur la santé du patient.

De manière générale, ce travail apporte une plus-value par l'étude à la loupe de ce paramètre pertinent et d'actualité que constituent les particules dans les médicaments à usage parentéral, et apporte la preuve de la qualité des médicaments produits quotidiennement par le laboratoire B.Braun et perfusés à des millions de patients à travers le monde.

LES MOTS CLES :

- particules
- perfusion
- validation
- méthode
- contamination

Contactez l'auteur :

wafa.elhadeuf@gmail.com

FILIERE :

Pharmacie Industrielle
