HAL
open science

Approche globale de la validation de la stérilisation par autoclavage : optimisation et choix stratégiques

Camille Dupuy

To cite this version:

Camille Dupuy. Approche globale de la validation de la stérilisation par autoclavage : optimisation et choix stratégiques. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-01803679

HAL Id: dumas-01803679

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01803679v1

Submitted on 30 May 2018

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.

Université de Bordeaux
U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2018 N°33

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
Par **Camille DUPUY**
Née le 2 avril 1992 à Bordeaux

Le 20 avril 2018 à Bordeaux

Approche globale de la validation de la stérilisation par autoclavage : optimisation et choix stratégiques

Directeur de thèse

Gaelle VACHER, Maître de conférences en Technologies Pharmaceutiques

Jury

Luc GRISLAIN, Professeur, Président du jury
Jean-François BIRON, Pharmacien
Catherine HEUREUDE, Ph. D, Docteur en Qualitologie

Remerciements

Je remercie le Pr Luc Grislain d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie Gaëlle Vacher et Catherine Heureude pour leur aide précieuse durant la préparation de cette thèse et pour avoir accepté de la diriger.

Je remercie également Jean-François Biron d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier toute l'équipe Qualification/Validation du site Ceva Santé Animale, à Libourne : mon maitre de stage Émilie Remoué, Damien De-Vaulx, Omar El-Harty. Leurs expériences et tous leurs conseils m'ont permis d'élargir mes connaissances et d'enrichir mon bagage professionnel.

Je remercie grandement Alix Pommier, maitre de stage de 5e année et désormais amie, pour le partage de son expertise dans le domaine de l'industrie, et ses fabuleux gâteaux !

Merci également à tous les professeurs de l'UFR de Pharmacie de Bordeaux et les professeurs du master Procédés de Production et Qualité des Produits de santé, à Toulouse pour votre précieux enseignement.

Merci à tous mes amis pour avoir partagé ces belles années d'étude et pour celles qui arrivent : Gus (20 ans d'amitié !), Juju (et Moby !), Loulou, Seilenn, Béa, Mickael, François, Marion, Rodolphe, Quentin, Toto, Alexis, Benoit, Jean, Kim, et tous les autres du Bloc et de Toulouse. Chacun à un bout de la France mais les retrouvailles ne seront que meilleures !

Et enfin, un merci très spécial à mes parents et mes frères, Baptiste et Benjamin : merci pour votre amour, votre soutien, votre patience depuis 26 ans. Ma réussite, je vous la dois.

Table des matières

Table des abréviations 5

Table des figures et tableaux 6

1. Introduction générale 7

2. Les procédés de stérilisation 9

2.1 **Introduction** 9

2.2 **Stérilisation par la voie chimique** 11

2.2.1. Stérilisation à l'oxyde d'éthylène 11

2.2.2. Stérilisation par le formaldéhyde 12

2.2.3. Stérilisation au gaz plasma de peroxyde d'hydrogène 13

2.3 **Stérilisation par irradiation** 15

2.3.1. Les électrons accélérés (rayonnements β) 15

2.3.2. Les rayonnements ϒ 16

2.3.3. Les rayons X 16

2.4 **Stérilisation par filtration** 18

2.5 **Stérilisation par traitement thermique** 20

2.5.1. Stérilisation par la chaleur sèche 20

2.5.2. Stérilisation par la chaleur humide 21

2.6 **Les autres méthodes de stérilisation** 22

2.6.1. La lumière pulsée 22

2.6.2. Hautes pressions hydrostatiques ou « Pascalisation » 23

2.6.3. Stérilisation à champs électriques pulsés 25

2.6.4. Les micro-ondes 25

2.7 **Conclusion sur les procédés de stérilisation** 27

3. La validation et la qualification : approche générale 34

3.1 **Le système qualité dans l'industrie pharmaceutique** 34

3.2 **La validation** 35

3.3 **Le Plan Directeur de Validation** 37

3.4 **La maîtrise des changements** 38

3.5 **Le dossier de qualification** 40

3.5.1. Définition de la qualification 40

3.5.2. Documentation 40

3.5.3. Les étapes de la qualification initiale d'un équipement 41

3.6 **Vérification de la validité d'une validation** 44

3.7 **Conclusion** 45

4. Méthodologie assurant la validation du procédé de stérilisation par autoclavage 46
4.1 **Introduction** 46
4.2 **La stérilisation à la chaleur humide** 47
4.2.1. L'autoclave 47
4.2.2. La stérilisation à la chaleur humide 48
4.2.3. Le cycle de stérilisation à la vapeur 49
4.2.4. Loi d'inactivation des micro-organismes 51
4.2.5. La valeur stérilisatrice F_0 54
4.2.6. Les témoins de stérilisation 56
4.3 **Les cycles de stérilisation de l'autoclave sur le site de production Ceva** 58
4.4 **Détermination du produit « worst-case »** 60
4.5 **La qualification initiale de l'autoclave pour stérilisation terminale** 67
4.5.1. Qualification de conception 67
4.5.2. Factury Acceptance Test 68
4.5.3. Qualification d'installation 68
4.5.4. Qualification opérationnelle 69
4.5.5. Qualification de performances 75
4.5.6. Conclusion 78
4.6 **Surveillance de la validation** 79
4.6.1. Recherches 79
4.6.2. Tests à effectuer en routine 81
4.6.3. Conclusion 84
4.7 **Conclusion sur l'optimisation de la validation du procédé de stérilisation par autoclavage** 86
5. Conclusion générale 87
6. BIBLIOGRAPHIE 88
ANNEXES 94
ANNEXE 1 : PARAMÈTRES DE STÉRILISATION DE CHAQUE AUTOCLAVE CEVA 95
ANNEXE 2 : ÉVOLUTION DE LA VALEUR STERILISATRICE F_0 EN FONCTION DU TEMPS LORS DE L'ÉTUDE DU WORST CASE PRODUIT 97
ANNEXE 3 : EXTRAIT DE LA PROCÉDURE DE QUALIFICATION ANNUELLE 99

Table des abréviations

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ATEX : Atmosphères Explosives

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

CIRC : Centre International de Recherche contre le Cancer

FAT : Factury Acceptance Test

GMP : Good Manufacturing Practice

IR : Infra-Rouge

NAS : Niveau d'Assurance de Stérilité

PID : Piping Instrumentation Diagram

PPI : Pour Préparations Injectables

PSF : Produit Semi-Fini

QC : Qualification de Conception

QI : Qualification d'Installation

QO : Qualification Opérationnelle

QP : Qualification de Performances

UV : Ultra-Violet

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Table des figures et tableaux

Table des figures

Figure 1. Réaction de l'oxyde d'éthylène avec l'extrémité N-Terminale d'une protéine
Figure 2. Réaction de l'oxyde d'éthylène avec une base guanine de l'ADN
Figure 3. Système de stérilisation au gaz plasma de peroxyde d'hydrogène
Figure 4. Les trois principales technologies de stérilisation par irradiation
Figure 5. Le criblage
Figure 6. L'impact inertiel
Figure 7. L'adsorption
Figure 8. Stérilisateur à chaleur sèche
Figure 9. Technologie de la lumière pulsée
Figure 10. Procédé des hautes pressions hydrostatiques
Figure 11. Technique des micro-ondes
Figure 12. Un des autoclaves de production du laboratoire Ceva
Figure 13. Schéma d'un cycle type de stérilisation à la vapeur
Figure 14. Représentation logarithmique de la décroissance en fonction du temps
Figure 15. Représentation logarithmique de la décroissance en fonction de la température
Figure 16. Variation du taux de létalité au cours d'un cycle thermique
Figure 17. Exemple d'un indicateur physico-chimique de classe 6 avant et après stérilisation
Figure 18. Exemple d'indicateur biologique
Figure 19. Produits à stériliser avec les thermocouples à l'intérieur
Figure 20. Schéma de l'emplacement des sondes et des produits dans la chambre de l'autoclave pour le premier essai
Figure 21. Exemple de changement de couleur uniforme sur un test de Bowie Dick
Figure 22. Schéma de l'emplacement des indicateurs biologiques
Figure 23. Tube et indicateurs pour le test Helix

Table des tableaux

Tableau 1. Paramètres principaux des différentes méthodes de stérilisation
Tableau 2. Avantages et inconvénients des différentes méthodes de stérilisation
Tableau 3. Combinaisons durée/température acceptables pour la stérilisation à la chaleur humide
Tableau 4. Paramètres de stérilisation des cycles et produits concernés
Tableau 5. Caractéristiques des produits à autoclaver
Tableau 6. Résultats des F_0 obtenus en fin de plateau, pour le 1er essai
Tableau 7. Résultats des F_0 obtenus en fin de plateau, pour le 2e essai
Tableau 8. Résultats des F_0 obtenus en fin de plateau, pour le 3e essai
Tableau 9. Identification des produits critiques pour chaque cycle de stérilisation
Tableau 10. Extrait de la table de Regnault
Tableau 11. Recommandations pour la validation de routine des autoclaves selon la littérature
Tableau 12. Récapitulatif de la validation de routine avant et après optimisation chez Ceva

1. Introduction générale

Afin de garantir la sécurité et la qualité des médicaments tout au long de leur vie, l'industrie pharmaceutique les produit selon des normes nationales, européennes et internationales rigoureuses. En France, tous les établissements fabricants doivent notamment se soumettre aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) destinées à assurer la qualité des médicaments et leur bonne conformité au dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM).

La validation et la qualification sont nécessaires pour prouver la maîtrise des étapes critiques interférant dans la fabrication du médicament. Elles permettent de réduire le risque de non-conformités et d'assurer la qualité.

La fabrication des médicaments stériles requiert une attention particulière en termes de qualité en vue de la sécurité de l'utilisateur. En effet, il est important de réduire au minimum les risques de contamination microbienne, particulaire et pyrogène pouvant survenir tout au long de la fabrication. Pour cela, l'assurance qualité joue un rôle primordial en mettant au point et en validant rigoureusement des méthodes de fabrication strictes afin d'obtenir à la fin de la production des produits stériles de qualité irréprochable.

Différentes normes réglementaires existent concernant la stérilisation et plus particulièrement les grands stérilisateurs tels que les autoclaves, mais celles-ci peuvent être parfois obscures et nécessitent d'être éclaircies. Qualifier un autoclave et valider le procédé de stérilisation, c'est garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament stérile produit. Par ailleurs, il convient, dans la mesure du possible, que les produits de santé destinés à être stériles soient stérilisés dans leur conditionnement final, grâce à une stérilisation terminale.

Le but de cette thèse est de développer une méthodologie permettant d'encadrer clairement la validation de la stérilisation par autoclavage afin d'obtenir un outil utilisable par chaque industrie.

Dans le respect des normes, le schéma de qualification des autoclaves est optimisé et étoffé. La surveillance continue du procédé de stérilisation par autoclavage est assurée grâce à la création d'un protocole standardisé détaillant les différents tests de routine à réaliser.

Nous verrons dans un premier temps les différentes méthodes de stérilisation existantes : des méthodes conventionnelles aux nouvelles technologies.

Une deuxième partie traitera des principes généraux de validation et qualification.

Enfin, nous appliquerons ces notions avec la mise la place d'une méthode logique et cohérente simplifiant le travail de validation sur un autoclave pour stérilisation terminale.

2. Les procédés de stérilisation

2.1 Introduction

La stérilisation est un procédé utilisé pour obtenir un produit stérile, c'est-à-dire, exempt de microorganismes viables. Ce procédé, quelle que soit sa nature, est satisfaisant quand la probabilité de retrouver des germes survivants est inférieure à 10^{-6}. C'est le Niveau d'Assurance de Stérilité (NAS).

D'après la Pharmacopée Européenne, « le NAS associé à un procédé de stérilisation donné, est exprimé comme la probabilité de présence de microorganismes survivants dans une unité du produit considéré, après exposition au procédé de stérilisation ». Un NAS de 10^{-6} correspond à la probabilité de non-stérilité de 1 unité sur 1 x 10^{6} unités stérilisées du produit final. L'inactivation des microorganismes suit une loi exponentielle, il existe donc toujours une probabilité non nulle qu'un microorganisme puisse survivre au procédé de stérilisation. (1)

Les domaines d'application de la stérilisation dans l'industrie pharmaceutique sont larges :

- Matières premières,
- Articles de conditionnement,
- Matériels de production,
- Locaux,
- Médicaments (préparations injectables, ophtalmiques, à application cutanée…).

La stérilisation repose sur une méthode efficace vis-à-vis de tous les microorganismes, sans altération du matériel ou produit à stériliser. De plus, pour les produits contenus, le conditionnement doit être perméable à l'agent stérilisant afin d'assurer le maintien de la stérilité du produit tout au long de sa durée de conservation.

Un microorganisme est une entité vivante, visible uniquement à travers un microscope, qui comprend une seule cellule, des amas de cellules ou des organismes multicellulaires relativement complexes. Les microorganismes comprennent les bactéries, les champignons et les virus dans divers états.

Un micro-organisme peut être tué de plusieurs manières :

- Par dénaturation des protéines,
- Par oxydation,

- Par filtration,
- Par l'interruption de la synthèse d'ADN ou de la réparation,
- Par perturbation de la synthèse de protéines,
- Par perturbation des membranes cellulaires. (2)

Afin d'éliminer ces micro-organismes, différentes méthodes de stérilisation sont définies par la Pharmacopée Européenne :

- Stérilisation par la voie chimique :
    - Agents alkylants (oxyde d'éthylène par exemple)
    - Agents oxydants (peroxyde d'hydrogène par exemple)
- Stérilisation par irradiation :
    - Electrons accélérés
    - Rayonnement ϒ
    - Rayons X
- Méthodes thermiques :
    - Stérilisation par la chaleur sèche
    - Stérilisation par la chaleur humide (vapeur)
- Filtration. (1)

Nous détaillerons dans cette partie des méthodes conventionnelles préconisées par la Pharmacopée, mais aussi de nouvelles méthodes peu ou pas encore utilisées à ce jour.

2.2 Stérilisation par la voie chimique

2.2.1. Stérilisation à l'oxyde d'éthylène

L'oxyde d'éthylène est un gaz stérilisant qui exerce son activité bactéricide par une réaction d'alkylation des acides nucléiques des cellules (hydroxyéthylation irréversible au niveau de l'azote des bases puriques) mais aussi de certaines protéines. Ce mécanisme explique le large spectre d'activité de l'oxyde d'éthylène notamment vis-à-vis des formes végétatives des spores[1]. (3)

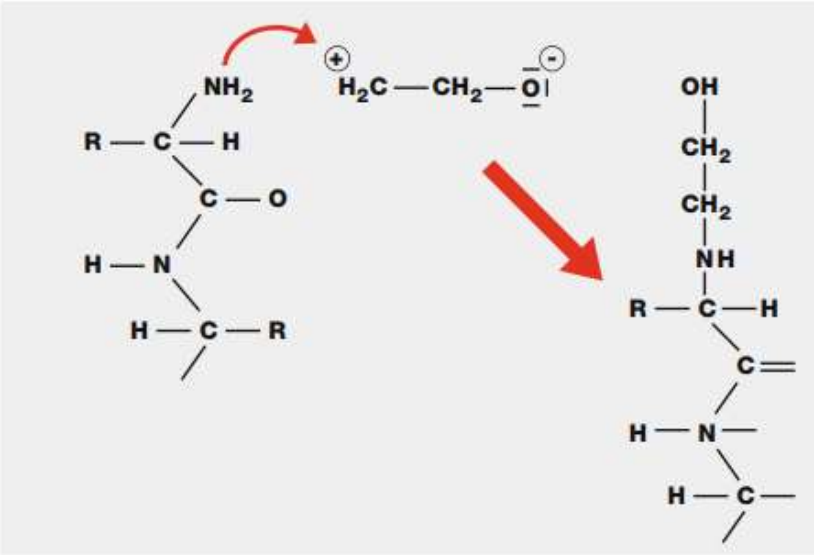


Figure 1. Réaction de l'oxyde d'éthylène avec l'extrémité N-Terminale d'une protéine

[1] La forme sporulée est la forme de résistance de la bactérie. Ces spores sont capables de résister à la sécheresse, à certains désinfectants, à des températures comprises entre 60 et 100°C environ et aux rayons UV.

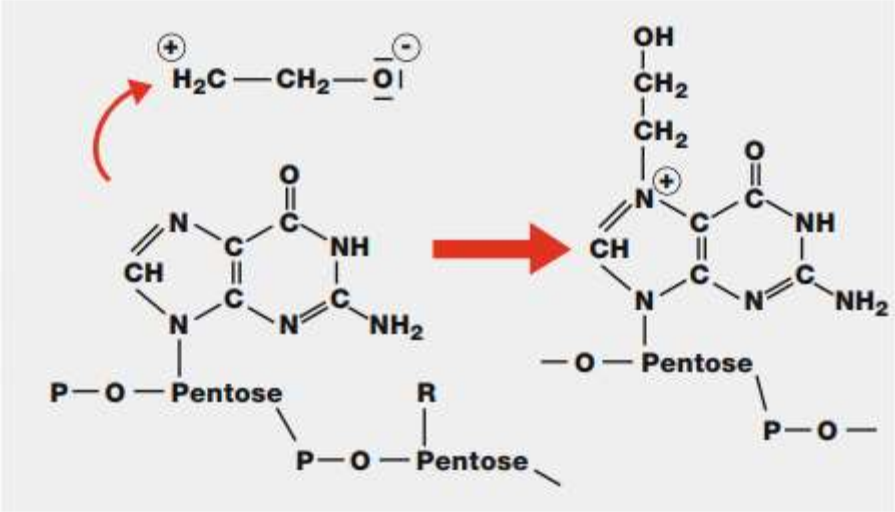


Figure 2. Réaction de l'oxyde d'éthylène avec une base guanine de l'ADN (4)

La stérilisation à l'oxyde d'éthylène est un processus à basse température (généralement entre 40 et 60 ° C). Il est utilisé à l'état gazeux et généralement mélangé avec d'autres substances, comme le CO_2 ou la vapeur, et est principalement utilisé sur les produits sensibles à la chaleur de la stérilisation en autoclave, comme le matériel en plastique. Une partie de l'oxyde d'éthylène est absorbé pendant l'exposition, et plus particulièrement dans les matières plastiques. Il doit donc être désorbé grâce à des cycles de dégazage avant utilisation du matériel stérilisé, ce qui rend ce procédé très long. Le cycle de stérilisation n'est que de 2h30 mais la désorption peut durer 8h, voire plus. (5–7)

Ce procédé est bien connu et utilisé depuis de nombreuses années pour sa pénétration dans la plupart des matériaux, et plus particulièrement les produits thermosensibles (avec composants électroniques, plastiques…). En revanche, il présente un inconvénient majeur : sa toxicité. En effet, l'oxyde d'éthylène est un gaz toxique, cancérigène, inflammable et explosif ; il est donc nécessaire d'utiliser une zone de sécurité interne ATEX. (8,9)

2.2.2. Stérilisation par le formaldéhyde

Le formaldéhyde est obtenu par chauffage d'une solution de formol et son action bactéricide est identique à celle de l'oxyde d'éthylène : réaction de dénaturation protéique. Le procédé ressemble également à celui de l'oxyde d'éthylène : le formaldéhyde est admis dans une étuve

sous forme gazeuse à basse température (entre 50°C et 80°C) mais son cycle de stérilisation est plus court, ne nécessitant pas de désorption supplémentaire (3 à 4h). (10)

Le formaldéhyde est surtout un agent stérilisant de surface, car sa pénétrabilité est moindre que l'oxyde d'éthylène. Ceci est dû à la taille de ces deux molécules : la molécule d'oxyde d'éthylène étant plus petite que celle du formaldéhyde, son activité en est augmentée. (11)

En juin 2004, le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC) a modifié la classification du formaldéhyde le faisant passer de la catégorie « substance probablement cancérogène pour l'homme » (groupe 2A) à « substance cancérogène avérée pour l'homme » (groupe 1). Pour cette raison, ce procédé est quasiment abandonné en France et doit faire l'objet de substitution. (12)

2.2.3. Stérilisation au gaz plasma de peroxyde d'hydrogène

Les gaz plasma sont considérés comme le quatrième état de la matière (liquide, solide, gaz et gaz plasma). Ce sont des gaz fortement ionisés par un agent physique extérieur (champ électrique, chaleur). Dans ce procédé de stérilisation, le gaz utilisé est le peroxyde d'hydrogène, admis à basse température (40 - 60°C) et à très basse pression. Il est excité par un champ électromagnétique et génère des radicaux libres d'oxygène à pouvoir hautement stérilisant. Ce procédé convient pour des matériaux thermosensibles. (13–15)

Figure 3. Système de stérilisation au gaz plasma de peroxyde d'hydrogène (16)

L'avantage de ce procédé par rapport à l'oxyde d'éthylène est qu'il génère uniquement de la vapeur d'eau et donc aucun résidu toxique. Aussi, les consommables ne sont ni explosifs, inflammables ou toxiques et le cycle est beaucoup plus rapide : entre 1 et 2h. (17)

Cette méthode est compatible avec la plupart des matériaux (> 95%) sauf avec les poudres, liquides, cellulose, mousse, nylon, et cuivre. (18)

2.3 Stérilisation par irradiation

La stérilisation par irradiation permet de stériliser un dispositif conditionné dans son emballage définitif, sans élévation excessive de la température. Quelle que soit la nature du rayonnement (électrons accélérés, rayonnements ϒ ou rayons X), l'action bactéricide résulte d'une ionisation des molécules vitales de micro-organismes (ADN, protéines, eau). (19)

Il existe deux types de rayonnements :

- Les rayonnements ionisants : Rayons X, ϒ et β qui vont dégrader l'ADN simple brin ou parfois double brin et auront un effet sur d'autres composants cellulaires vitaux (enzymes…).
- Les rayonnements non-ionisants : UV et IR
    - Les rayonnements UV assurent la réduction des germes mais leur pénétration est peu importante et donc ils ne seront pas utilisés en industrie pharmaceutique pour la stérilisation mais plutôt pour le traitement de l'eau
    - Les rayonnements IR ne sont pas pénétrants et ne sont pas utilisés pour la stérilisation. (2)

2.3.1. Les électrons accélérés (rayonnements β)

Dans ce type de stérilisation par rayonnement, un accélérateur génère un flux concentré d'électrons et dirige le flux à travers un cornet de balayage sur les articles à stériliser. Il s'agit d'un procédé basé sur l'électricité. (20,21)

Comme le produit/matériel passe en dessous ou en face du faisceau d'électrons, l'énergie des électrons est absorbée, en modifiant diverses liaisons chimiques et biologiques et en détruisant l'ADN et les capacités de reproduction des micro-organismes. (22)

La pénétration des électrons accélérés permet de traiter des cartons de faible hauteur et faible densité très rapidement : l'ensemble du processus peut avoir lieu en seulement quelques minutes. De plus, il est possible d'utiliser des débits de dose (dose absorbée par unité de temps) plus importants qu'avec les rayons ϒ ou X. (20,21)

2.3.2. Les rayonnements ϒ

Les sources de rayonnements ϒ utilisées à ce jour sont des sources à Cobalt 60 : ^{60}Co. On soumet des capsules renfermant du ^{59}Co au flux de neutrons d'un réacteur nucléaire. L'isotope ^{60}Co se transforme en élément stable, le ^{60}Ni, en émettant deux rayonnements ϒ et un rayonnement β.
Lorsque le rayonnement ϒ pénètre la matière, il ionise les atomes et forme des radicaux libres responsables de l'activité germicide. (3)

L'avantage principal de cette technologie par rapport aux électrons accélérés est qu'elle permet une stérilisation par palettes et non par cartons, ce qui contrebalance avec sa durée de stérilisation plus longue (en heures). Son excellente pénétration va irradier une unité pouvant être composée de produits de densité, de matériaux, de configurations et d'orientation variés. (23)

2.3.3. Les rayons X

Le rayonnement X est une énergie électromagnétique (photons) avec des longueurs d'onde similaires aux photons gamma. La génération de rayons X est réalisée lorsque des électrons accélérés interagissent avec des noyaux d'atomes dans un élément « cible ». Lorsque les électrons de haute énergie s'approchent des atomes dans le matériau cible, l'interaction les ralentit et l'énergie est libérée sous la forme d'un rayon X. Plus l'élément est lourd (par son numéro atomique), plus l'efficacité de conversion des rayons X est grande. Par conséquent, très peu de rayons X sont générés dans des matériaux constitués d'éléments à faible numéro atomique (tels que plastiques, etc.), tandis que les métaux comme le tantale (Ta) ou le tungstène (W) sont de très bons générateurs de rayons X. (24)

Cette méthode, plus récente et donc moins utilisée, possède les avantages des rayonnements ϒ et β sans les inconvénients. (25)

Les rayons X offrent la commodité d'avoir un équipement électrique facile à utiliser qui peut fonctionner en fonction des exigences de production : possibilité d'éteindre la source à tout moment comme pour les électrons accélérés et contrairement aux rayons ϒ. (26)

Le schéma ci-dessous illustre les différentes méthodes de stérilisation par irradiation. On y voit bien que les méthodes par faisceau d'électrons accélérés et par rayons X fonctionnent grâce à une source électrique, alors que la méthode par rayonnement ϒ fonctionne grâce à une source radioactive : le cobalt 60. On remarque également que les électrons accélérés ne vont irradier qu'une couche de cartons tandis que les rayons X et ϒ peuvent irradier une palette entière.

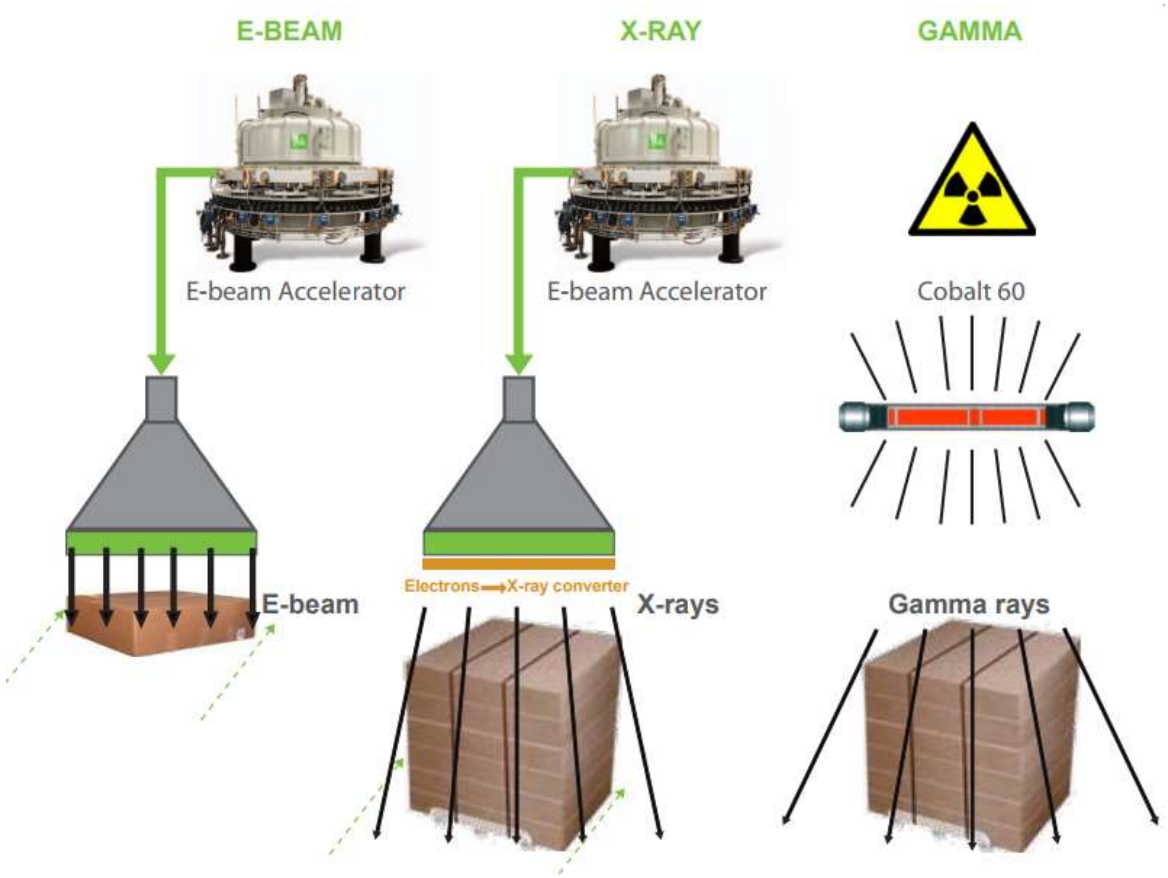


Figure 4. Les trois principales technologies de stérilisation par irradiation (21)

2.4 Stérilisation par filtration

Cette méthode de stérilisation s'applique aux fluides monophasiques (gaz et liquide). On utilise celle-ci lorsque la solution renferme un principe actif thermolabile, sensible aux gaz ou aux radiations, pour ne pas le dégrader. Contrairement aux autres méthodes, elle ne repose pas sur l'inactivation des micro-organismes mais sur leur élimination du produit.

Lors de la filtration, différents mécanismes de rétention des particules existent :

- Le criblage : lorsque la particule est de taille supérieure à la taille des pores de la membrane filtrante, celle-ci est retenue ;

Figure 5. Le criblage (27)

- L'impact inertiel : les particules sont piégées dans les recoins du média filtrant ;

Figure 6. L'impact inertiel (27)

- L'adsorption sur le média filtrant.

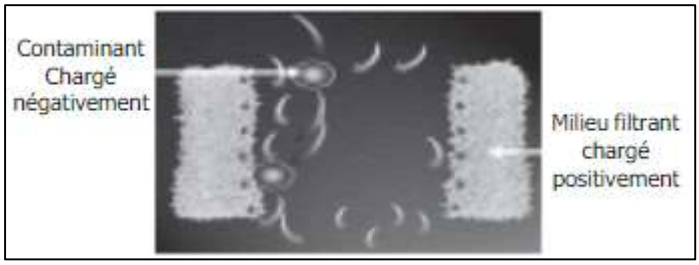


Figure 7. L'adsorption (27)

La stérilisation par filtration nécessite une grande rigueur au niveau de la production : elle implique en effet un traitement aseptique[2] de la solution. Tout le matériel de filtration et de répartition doit être préalablement stérilisé sans oublier tous les éléments des contenants de réception de la solution (flacon, bouchon, capsule).

Pour être efficace, l'étape de filtration doit être réalisée le plus tôt possible après la préparation de la solution et doit être réduite au minimum de temps. (3)

Selon la taille des particules, il existe plusieurs types de filtration :

- Particules > 10 µm = filtration
- Particules [0,2 – 10 µm] = microfiltration
- Particules < 0,02 µm = ultrafiltration

La pharmacopée européenne demande d'utiliser des membranes à porosité nominale ≤ 0,22 µm. (1)

[2] Le traitement aseptique correspond à la manipulation de produits stériles dans un environnement contrôlé, dans lequel l'alimentation en air, les matériaux, l'équipement et le personnel sont définis afin de maintenir la stérilité. (28)

2.5 Stérilisation par traitement thermique

2.5.1. Stérilisation par la chaleur sèche

Il s'agit d'une stérilisation à l'air chaud à pression atmosphérique. Elle se pratique en étuve qui porte le nom de son inventeur, le Dr POUPINEL, munie d'un ventilateur qui permet d'obtenir une bonne homogénéité de température dans l'enceinte. La chaleur sèche fonctionne en dénaturant les enzymes et les acides nucléiques par oxydation.

Figure 8. Stérilisateur à chaleur sèche (29)

La Pharmacopée Européenne préconise une température minimale de 160°C pendant au moins 2h30 lorsque cette méthode est utilisée comme stérilisation finale. C'est une technique beaucoup plus longue que la stérilisation à la chaleur humide (l'air sec étant un faible conducteur de chaleur). (30)

Le problème majeur de cette méthode est la mauvaise homogénéité de la température dans l'étuve. Il est possible d'améliorer l'homogénéité avec le ventilateur, mais cela rend impossible la stérilisation de poudres qui pourraient s'envoler et se répandre. Cette méthode est donc préférée pour les matériaux en métal ou en verre. (31)

2.5.2. Stérilisation par la chaleur humide

La stérilisation par la chaleur humide, au moyen de vapeur d'eau saturée, est le procédé de stérilisation à recommander car le plus fiable et le plus facile à valider et à contrôler. Cette méthode reste donc le premier choix pour le matériel résistant au vide, à l'humidité, aux températures et aux pressions élevées.

La vapeur d'eau va diffuser dans toute la chambre du stérilisateur. Étant toujours à une température plus élevée que l'objet à stériliser, cela entraîne une condensation et des transferts d'énergie qui assurent la destruction des microorganismes par hydrolyse des chaînes peptidiques.

Pour être en contact en tout point avec les produits à stériliser, la vapeur d'eau doit remplacer l'air naturellement contenu dans la cuve. L'air est donc préalablement chassé grâce à une succession d'alternances de vides et d'injections de vapeur. Vient ensuite le palier de stérilisation suivi d'une phase de séchage qui termine le cycle de stérilisation. (32)

Le procédé à la vapeur sous pression repose sur un équilibre thermodynamique entre la pression et la température, qui doit être maintenu durant les différentes phases du processus de stérilisation et qui n'est atteint que dans des conditions où la vapeur d'eau est en saturation. (30)

Nous verrons cette technique plus en détail dans la partie 4.2.

2.6 Les autres méthodes de stérilisation

2.6.1. La lumière pulsée

Le système de lumière pulsée utilise des flashs de lumière intense émise par une lampe à xénon. Ces flashs de lumière sont de très forte intensité : 20 000 fois la lumière du soleil à la surface de la terre, pour la technologie CLARANOR[3]. Le spectre d'émission de la lampe couvre la totalité du spectre de la lumière blanche, tout en étant particulièrement riche en UV, connus pour leur effet germicide. (33)

Le mécanisme n'est pas encore très clair à l'heure actuelle mais la destruction des microorganismes présents dans le produit soumis au traitement, serait le résultat de la combinaison d'une réaction photochimique et d'un effet photothermique.

Effet photochimique :
L'absorption des rayons UV par l'ADN des microorganismes provoque la rupture des doubles brins et la formation de liaisons anormales au sein d'un même brin, ce qui empêche ainsi la réplication de l'ADN. La production des protéines et donc le métabolisme des cellules sont ainsi bloqués, entraînant la mort du microorganisme.

Effet photothermique :
Les UV, absorbés par les microorganismes, provoquent une augmentation brutale de température. Cette élévation de température (jusqu'à 150 °C) provoque la rupture des membranes cellulaires et la destruction des microorganismes. La température du produit traité n'augmente pas au niveau macroscopique et la lumière pulsée reste un procédé athermique. Aucune modification chimique n'est observée suite au traitement.

L'énergie intense délivrée par les flashs sur un laps de temps très court augmente l'effet létal des UV.

[3] Claranor est une société avignonnaise, créée en 2004, spécialisée dans la stérilisation des emballages via la technologie de la lumière pulsée.

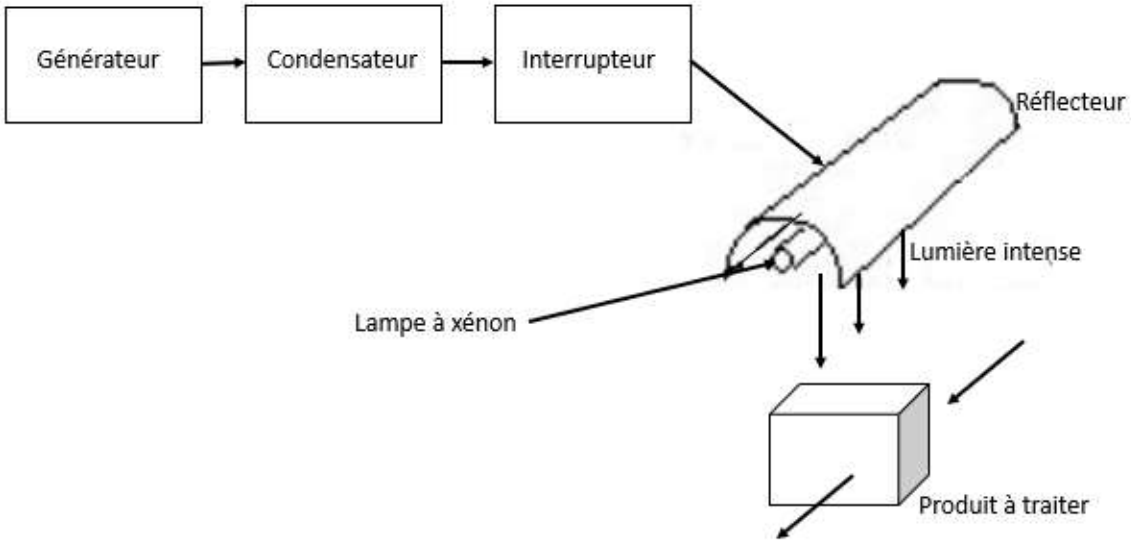


Figure 9. Technologie de la lumière pulsée (34)

Le niveau de décontamination obtenu est dépendant du nombre et de la puissance des flashs appliqués, et va de la simple réduction logarithmique à la stérilisation complète. Grâce au mode impulsionnel des flashs, les performances obtenues sont supérieures à celles obtenues avec les UV continus.

La lumière pulsée, bien que les premiers brevets aient été déposés en 1986, est un procédé qui a été transféré à l'échelle industrielle que récemment, et pour le moment, principalement dans le domaine agro-alimentaire.

Malgré ses nombreux avantages (athermique, rapide, non toxique, faible coût etc.), cette technologie présente un inconvénient majeur : elle ne permet qu'une stérilisation de surface, la lumière ne traversant pas les objets opaques, ou trop volumineux. (35)

2.6.2. Hautes pressions hydrostatiques ou « Pascalisation »

La pascalisation est un processus qui utilise les hautes pressions. Selon le principe de Le Chatelier-Braun, « si une chose peut diminuer de volume, elle se contractera si on la comprime ». Cette réduction peut être obtenue, soit par un simple rapprochement des

molécules, soit par une réaction chimique entre molécules, soit par contraction intramoléculaire. (36)

La pression appliquée est isostatique, c'est-à-dire qu'elle est identique dans toutes les directions de l'espace, en tout point de l'enceinte et donc du produit. L'intensité des pressions utilisées varie de 2 000 à 7 000 bars. Enfin, l'action de la pression s'effectue la plupart du temps à température modérée (<70°C). (34)

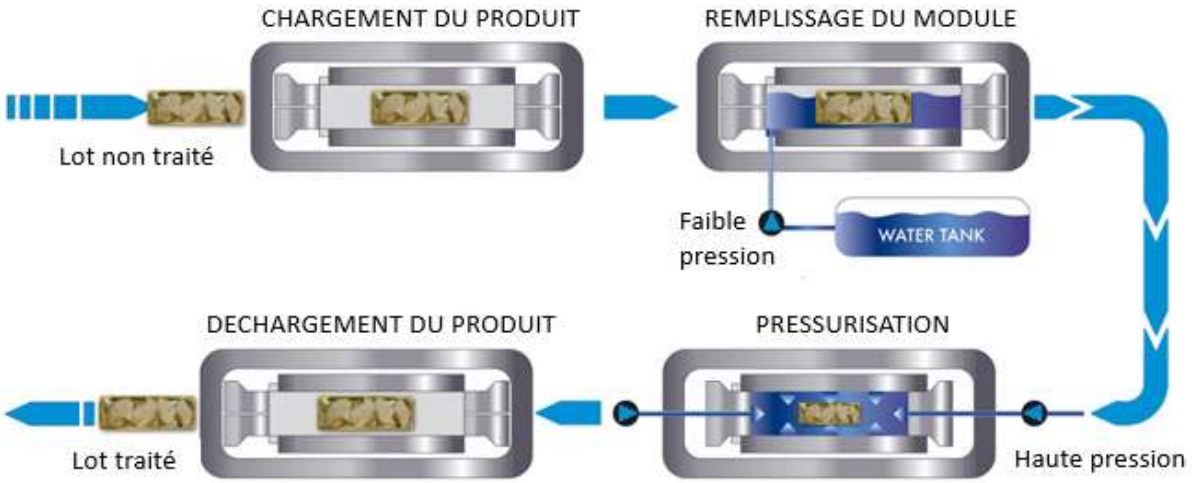


Figure 10. Procédé des hautes pressions hydrostatiques (37)

Les hautes pressions sont capables d'inactiver la plupart des micro-organismes en entrainant des modifications de leurs membranes cellulaires.

Dans le domaine de la santé, la stérilisation par pascalisation permet d'inactiver des micro-organismes très pathogènes comme le VIH, les produits thermosensibles. Mais ce type de stérilisation, surtout utilisée en agro-alimentaire, n'est pas encore développé par l'industrie pharmaceutique. Le principal frein est probablement son inefficacité sur les spores ainsi que sa rentabilité économique encore faible. (38,39)

2.6.3. Stérilisation à champs électriques pulsés

Le procédé des champs électriques pulsés consiste à soumettre un produit à des champs électriques de très forte intensité, de manière répétée, pendant des temps très courts. (40)

L'exposition d'une cellule à un champ électrique extérieur induit une différence de potentiel électrique de part et d'autre de la membrane. Lorsque ce champ électrique est très intense, le potentiel transmembranaire va être supérieur au potentiel transmembranaire naturel de la cellule. Cela induit une répulsion entre les molécules chargées, il y a alors formation de pores dans la membrane cellulaire qui aboutira à la mort de la cellule.

Cette méthode ne convient qu'aux fluides non visqueux et son efficacité est fortement influencée par la conductivité électrique du produit. De plus, malgré que ce procédé soit considéré comme athermique, il peut y avoir une augmentation de température du milieu traité dépendant de l'énergie fournie.

En raison de la protection supplémentaire que les spores ont autour de leur membrane (cortex, paroi…), leur inactivation nécessite des champs électriques élevés et de longs temps de traitement, sans être jamais totalement complète. Une inactivation radicale des spores peut être atteinte en combinant les champs électriques pulsés avec un autre procédé (par exemple un traitement à haute pression, un traitement thermique, des produits chimiques). (34,41,42)

Cette technique n'est pas encore utilisée dans l'industrie pharmaceutique, seulement dans l'industrie agro-alimentaire.

2.6.4. Les micro-ondes

L'onde électromagnétique est généralement engendrée par un magnétron et se propage jusqu'au produit à traiter dans un guide d'ondes qui est souvent un tube de section rectangulaire. Les ondes sont ensuite transmises au produit par un applicateur adapté : guides à fentes, antennes...

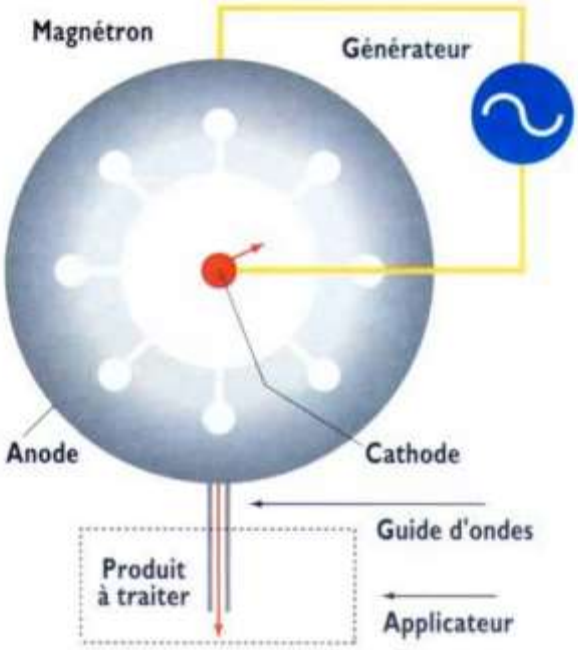


Figure 11. Technique des micro-ondes (34)

Le rayonnement non ionisant des micro-ondes induit des conditions hyperthermiques qui affecte les molécules d'eau et les membranes cellulaires des micro-organismes. La température produite, bien qu'élevée, reste inférieure à la méthode de stérilisation à la vapeur. (14)

Bien que la technologie des micro-ondes soit rapide et simple à utiliser, il existe des freins à son développement en industrie, comme le manque d'homogénéité de traitement pour les produits conditionnés, ainsi qu'un effet de surchauffe sur les bords du produit traité. (34,43,44)

2.7 Conclusion sur les procédés de stérilisation

De nombreuses techniques de stérilisation existent et de nouvelles méthodes sont encore à l'essai. Il ne faut pas oublier que ces méthodes reposent sur un nettoyage en amont ainsi que des conditions de stockage en aval satisfaisants.

Chaque méthode est différente et c'est à l'industriel de choisir celle qui sera le plus adaptée aux produits à stériliser, tout en sachant que la première intention d'après la Pharmacopée, est, si possible, la stérilisation à la chaleur humide.

Le tableau 1 récapitule les différents paramètres de chaque méthode de stérilisation avec :

- La température de fonctionnement,
- La durée du cycle de stérilisation,
- La simplicité de l'installation et de l'utilisation,
- La pénétration ou l'homogénéité de la méthode sur le produit à stériliser,
- L'effet létal sur les spores,
- La toxicité ou la dangerosité lors de l'utilisation de la méthode,
- Le type de matière pouvant ou pas être stérilisé,
- Le coût qui correspond plutôt au coût d'achat (et non au rendement économique).

Le tableau 2 présente les avantages et les inconvénients de chaque technique.

Tableau 1. Paramètres principaux des différentes méthodes de stérilisation

METHODE		Température	Durée cycle	Utilisation Installation	Pénétration Homogénéité	Effet sur spores	Toxicité/ Dangerosité	Matières	Coût	Réf
Oxyde d'éthylène (OE)		40 - 60°C	>10h	Utilisation facile Installation complexe	Grande	Oui	Grande	La plupart des matières	Élevé	(3,6 –9)
Formaldéhyde		50 – 80°C	3 – 4h	Difficile	Moyenne < OE	Oui	Cancérogène	Pas sur métaux et verre	Faible	(10 – 12)
Gaz Plasma de peroxyde d'hydrogène		6 – 60°C	1 – 2h	Facile	Bonne	Oui	Aucune	Pas de poudres, liquides, cellulose, mousse, nylon, cuivre	Élevé	(13 – 15, 17, 18)
Rayonnements	**Electrons accélérés**	Basse	Très rapide (qq minutes)	Complexe	Grande < Rayons ϒ	Oui	Grande	Pas d'acétal, téflon, certains polymères	Élevé <Rayons ϒ et X	(10, 20–22)
	ϒ	Basse < 20°C	Heures > Rayons X	Complexe	Grande	Oui	Grande	Pas d'acétal, téflon, certains polymères	Élevé	(10, 20, 21, 23, 25)
	X	Basse	Heures	Complexe	Grande = Rayons ϒ	Oui	Grande	Pas d'acétal, téflon, certains polymères	Élevé	(10, 21, 45)

Filtration	Basse	Non applicable	Difficile	Non applicable	Oui	Aucune	Fluides seulement	NA[4]	(3,8)
Stérilisation à la chaleur sèche	160°C	2h30	Facile	Mauvaise	Oui	Aucune	Verres, métaux, thermorésistants	Faible	(30, 31, 46)
Stérilisation à la chaleur humide (autoclaves)	121°C	20 – 60 min	Facile	Grande	Oui	Aucune	Thermorésistants	Faible	(1,9,32)
Lumière pulsée	Basse	Rapide	Facile	Mauvaise	Oui	Aucune	Matériel transparent et lisse	Faible	(35, 47, 48)
Pascalisation (Hautes pressions hydrostatiques)	< 70°C	Rapide (minutes)	NA	Bonne	Non	Aucune	Produits conditionnés dans emballage souple	Élevé	(34, 36, 39)

[4] NA = Not Available (information non disponible)

Champs électriques pulsés	Basse	Rapide	Difficile	NA	Non	NA	Fluides non visqueux	Elevé	(34, 40, 42)
Micro-ondes	Élevée	Rapide	Facile	Mauvaise	Oui	Très < aux rayonnements ionisants	NA	Faible	(34, 43, 49)

Tableau 2. Avantages et inconvénients des différentes méthodes de stérilisation

METHODE	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS	RÉFÉRENCES
Oxyde d'éthylène	- Pour produits thermosensibles - Facilité d'utilisation à grande échelle - Très pénétrant	- Toxique, inflammable, cancérigène, explosif - Cycle long (plusieurs jours) - Coût des mélanges ininflammables	(8,9)
Formaldéhyde	- Pour produits thermosensibles - Matière première peu onéreuse	- Mauvaise pénétration → surtout en surface - Procédé difficile à maîtriser (gaz instable) - Cycle long (3 - 4h) - Corrosif sur certains matériaux - Cancérogène, irritant	(10,11)
Gaz Plasma de peroxyde d'hydrogène	- Pour produits thermosensibles - Non toxique - Utilisation simple - Cycle rapide (1 - 2h) - Pas d'endommagement des matériaux	- Non compatible avec certaines matières (poudres, liquides, cellulose…) - Chambre de stérilisation plus petite que par l'oxyde d'éthylène	(10,17,18,50)
Rayonnements	- Bonne pénétration - Pour produits thermosensibles - Procédés reproductibles et fiables - Traitement dans emballage définitif - Pas de produits nocifs engendrés	- Dangerosité des rayonnements - Coût - Dégradation de certains matériaux	(10)

METHODE	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS	RÉFÉRENCES
Filtration	- Produits thermosensibles, sensibles aux gaz et/ou aux radiations	- Seulement pour les fluides - Non possible dans emballage définitif - Procédé difficile : nécessité d'une répartition aseptique	(3,8)
Stérilisation à la chaleur sèche	- Utilisation simple - Peu coûteux	- Non possible pour produits thermosensibles - Homogénéité de température incertaine - Pour produits secs et anhydres - Moins efficace et moins rapide que autoclaves	(30,46)
Stérilisation à la chaleur humide (autoclaves)	- Technique fiable et reconnue - Peu coûteux - Aucuns composés toxiques - Simple et non polluant	- Seulement pour produits résistants à la chaleur, l'humidité et la pression	(9)
Lumière pulsée	- Athermique et sèche - Très rapide - Pas d'agents chimiques - Coût - Travail en continu	- Traitement surtout de surface → pénétration nulle pour objets opaques - Effets d'ombre selon la géométrie du matériel → efficacité hétérogène	(34,35,48)

METHODE	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS	RÉFÉRENCES
Pascalisation (Hautes pressions hydrostatiques)	- Pour produits thermosensibles	- Non efficace sur les spores - Rentabilité économique faible - Non adaptée pour les produits secs	(36,38)
Champs électriques pulsés	- Procédé rapide - Pour produits thermosensibles	- Non efficace sur les spores - Réservé aux fluides non visqueux - Produits à haute conductivité non traitables - Industrialisation difficile	(34,42)
Micro-ondes	- Procédé rapide - Utilisation simple	- Stérilisation hétérogène pour les produits conditionnés - Rendements pas meilleurs qu'avec les autres méthodes	(34,43)

La méthode de stérilisation à la vapeur d'eau (ou chaleur humide) reste la méthode de référence car la plus fiable, la moins coûteuse et la plus simple à utiliser et à recommander, si le produit à stériliser est thermorésistant.

Par contre, si le produit à stériliser est thermolabile, une autre méthode doit être envisagée. À l'heure actuelle, l'oxyde d'éthylène ou les rayonnements restent les procédés les plus utilisés et les plus adaptés à l'industrie pharmaceutique. Du fait de sa toxicité, le remplacement de l'oxyde d'éthylène par un gaz plasma de peroxyde d'hydrogène serait souhaitable. Parmi les différents types de rayonnements, les rayons X, encore peu utilisés, semblent pourtant être la meilleure alternative.

3. La validation et la qualification : approche générale

3.1 Le système qualité dans l'industrie pharmaceutique

D'après la norme NF ISO 9000, la qualité des produits et services d'un organisme est déterminée par la capacité à satisfaire les clients et par l'impact prévu et imprévu sur les parties intéressées. (51)

L'objectif central d'un système qualité est la production constante de produits fiables et satisfaisant les parties intéressées pertinentes et veiller à ce que ces activités soient durables. Pour cela, les systèmes de qualité réussis partagent les caractéristiques suivantes :

- Approches fondées sur la science ;
- Décisions basées sur la compréhension de l'usage prévu d'un produit ;
- Identification appropriée et contrôles des zones de faiblesse potentielle d'un processus ;
- Déviation et systèmes d'investigation menant à la remédiation de ces faiblesses ;
- Méthodes pour évaluer et réduire le risque ;
- Processus bien définis et bien produits, tout au long du cycle de vie du produit ;
- Systèmes pour une analyse attentive de la qualité du produit.

Entièrement développé et efficacement géré, un système qualité mènera à des processus cohérents prévisibles qui assurent que les produits pharmaceutiques soient sûrs, efficaces et disponibles pour le consommateur. (52)

Dans le traitement aseptique, il est aussi important de valider le procédé utilisé pour stériliser un équipement critique, que de valider ceux déjà existants pour stériliser le médicament ainsi que son contenant et son système de fermeture. (53)

D'après les BPF, « La gestion de la qualité est un large concept qui couvre tout ce qui peut, individuellement ou collectivement, influencer la qualité d'un produit. Elle représente l'ensemble des dispositions prises pour garantir que les médicaments sont de la qualité requise pour l'usage auquel ils sont destinés ».

3.2 La validation

La validation d'un processus est définie comme la collecte et l'évaluation des données, depuis la phase de conception jusqu'à la production commerciale, qui établit la preuve scientifique que celui-ci est capable de fournir un produit de qualité, de façon constante.

Cette validation implique une série d'activités se déroulant tout au long du cycle de vie du produit et du processus. Les activités de validation se déroulent en trois étapes :

- Étape 1 - Conception du processus. Au cours de cette étape, le processus de fabrication commercial est défini en fonction des connaissances acquises lors des activités de développement et des activités de mise à l'échelle.

- Étape 2 - Qualification du procédé. Au cours de cette étape, la conception du procédé est évaluée pour déterminer si le procédé est capable de reproduire une fabrication commerciale.

- Étape 3 - Vérification du processus. L'assurance qualité constante au cours de la production de routine assure que le processus reste dans un état de contrôle. (54)

Les études de validation vérifient les systèmes dans les conditions extrêmes auxquelles on peut s'attendre au cours du procédé, de façon à prouver que la situation reste toujours sous contrôle. Une fois que le système ou le procédé ont été validés, leur maîtrise est censée être acquise définitivement, dans la mesure où aucune modification n'intervient. En cas de modifications, de problèmes, de remplacement du matériel ou de déplacement de celui-ci, il faut entreprendre une revalidation. Le matériel et les processus critiques font l'objet d'une revalidation systématique à intervalles réguliers pour établir que le procédé reste bien maîtrisé.

La validation, telle que définie dans les BPF, englobe plusieurs activités :

- La validation des procédés,
- La qualification,
- La validation du nettoyage,
- La validation des systèmes informatiques,
- La validation des méthodes analytiques.

En résumé, la validation sert à garantir la qualité du produit obtenu, fiabiliser les processus, minimiser les coûts, augmenter la productivité, diminuer le nombre de contrôles, diminuer les pertes et garantir la conformité à la législation. La validation est utilisée pour évaluer quelque chose de dynamique qui est amené à changer.

3.3 Le Plan Directeur de Validation

Le plan directeur de validation (ou Validation Master Plan) est un résumé de la stratégie de validation. Il couvre tout l'établissement et décrit le matériel, les systèmes, les méthodes et les procédés à valider, ainsi que le moment de ces validations. Il doit décrire les modèles requis pour chaque document de validation (qualification des installations, qualification opérationnelle, qualification des performances, validation des procédés, validation des essais analytiques).

Certains matériels ou appareils ne requièrent que la qualification d'installation et la qualification opérationnelle et on peut se contenter parfois de quelques paramètres pour les tests analytiques.

Tout ceci doit être expliqué dans le protocole principal, à côté des principes permettant de déterminer les qualifications requises pour chaque type de matériel et de la désignation des personnes responsables des validations à réaliser.

D'après l'annexe 15 des BPF, le plan directeur de validation comporte au moins les éléments suivants :

- Politique de qualification et de validation ;
- Structure organisationnelle de la validation avec les rôles et les responsabilités pour chaque activité ;
- Récapitulatif des installations, de l'équipement, des systèmes et des procédés sur le site et le statut actuel de qualification et de validation ;
- Contrôle des changements et gestion des déviations pour le processus de qualification et de validation ;
- Recommandations sur le développement des critères d'acceptation ;
- Références à des documents existants ;
- Stratégie de qualification et validation, y compris la requalification, le cas échéant. (55)

Ce document est rédigé par le service en charge de la qualification. Il sert de guide pour les personnes qui dirigent et accomplissent les opérations, et de document de référence pouvant être présenté à des inspecteurs des autorités sanitaires en donnant une vue d'ensemble à la qualification et prouvant le respect des BPF.

3.4 La maîtrise des changements

La maîtrise des changements (ou change control) constitue une partie importante du système qualité pharmaceutique. C'est une exigence réglementaire mise en avant par toutes les agences réglementaires internationales comme seul et unique moyen de garantir la maîtrise des procédés et la qualité du produit. C'est un processus qui doit être maitrisé car c'est ce processus qui garantit que les autres processus vont continuer à être maitrisés.

En effet, les études de qualification ou de validation sont conçues pour des paramètres bien définis et mesurent des résultats bien spécifiés. Toute modification apportée à du matériel, des systèmes, des processus ou des méthodes peut changer ces paramètres déjà validés, et doit donc être contrôlée.

L'Annexe 15 des BPF concernant la qualification et validation, préconise plusieurs choses dans son chapitre sur le contrôle des changements :

- « 11.2. Des procédures écrites doivent être mises en place pour décrire les mesures à prendre en cas de changement planifié pour une matière première, un composant du produit, un procédé, un équipement, des locaux, une gamme de produits, une méthode de production ou d'analyse, une taille de lot, un espace de conception ou tout autre changement au cours du cycle de vie susceptible d'affecter la qualité ou la reproductibilité du produit.
- 11.4. La gestion des risques liés à la qualité doit être utilisée pour évaluer les changements planifiés afin de déterminer l'incidence potentielle sur la qualité du produit, les systèmes de qualité pharmaceutique, la documentation, la validation, etc.
- 11.5. Les changements doivent être autorisés et approuvés par les personnes responsables ou le personnel compétent en la matière.
- 11.7. Après mise en œuvre, une évaluation de l'efficacité du changement doit être effectuée pour confirmer la réussite dudit changement ». (55)

Les modifications peuvent être liées à des pannes, à de la maintenance préventive ou curative par exemple. Pour chaque changement, il faut faire une analyse de risque afin d'évaluer les impacts probables.

Il faut prendre en compte les conséquences que peut entrainer une modification sur le système étudié, de même que les répercussions plus larges pour d'autres systèmes de

l’établissement. Selon l’importance de la modification, la revalidation du système/processus pourra s’avérer nécessaire.

3.5 Le dossier de qualification

3.5.1. Définition de la qualification

D'après les BPF, la qualification est « l'action de prouver et de documenter qu'un équipement est installé convenablement, travaille correctement et conduit réellement aux résultats attendus ». (55)

L'opération de qualification permet de vérifier et garantir la fiabilité des équipements, d'établir des procédures de fonctionnement, de prévoir la maintenance, l'entretien, le changement des éléments défectueux afin d'assurer la conformité aux normes ou spécifications définies et nécessaires à la qualité des produits fabriqués.

Elle va apporter une certaine maîtrise des aspects critiques des opérations. Elle apporte donc à l'entreprise un gain de temps et d'argent car elle évite toute la gestion des non-conformités.

En règle générale, la qualification du matériel ou des systèmes comprend quatre parties : la qualification de conception (QC), la qualification d'installation (QI), la qualification opérationnelle (QO) et qualification des performances (QP). Parfois, selon le fonctionnement et l'utilisation de certains matériel, seules la QI et la QO sont requises (par exemple, les pH-mètres, les congélateurs…). Les systèmes d'aération ou d'alimentation en eau ou en vapeur, ou le gros matériel exécutant des procédures critiques, comme la stérilisation, la dépyrogénation ou la lyophilisation, demandent une qualification complète avec QC, QI, QO et QP.

Il faut savoir que la validation englobe la qualification. En effet, la qualification est une étape de la validation car pour valider, il faut avoir du matériel qualifié.

3.5.2. Documentation

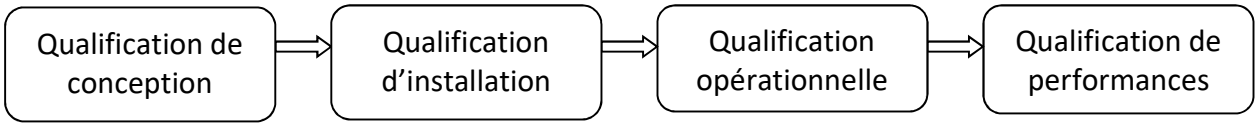
D'après les BPF, « Des politiques, procédures, des protocoles et des rapports écrits, ainsi que, le cas échéant, les enregistrements des actions décidées ou des conclusions doivent être établis pour les validations et qualifications des procédés, des équipements et des systèmes. »

Un protocole va décrire en détail l'étude globale et planifiée permettant d'examiner l'uniformité du fonctionnement d'un nouveau système ou équipement, une nouvelle méthode de contrôle ou la validité d'un nouveau procédé avant sa mise en œuvre. Les protocoles comprennent des informations générales concernant l'équipement, le système, la méthode ou le procédé. Ils expliquent les objectifs de l'étude et donnent une description complète des méthodes à suivre. Les paramètres à mesurer seront fixés, et des critères d'acceptation déterminés au préalable pour en tirer des conclusions. Les protocoles de validation sont importants pour garantir l'obtention des preuves documentées démontrant que les performances d'un élément du matériel, d'un système, d'un procédé ou d'une méthode sont constantes selon les spécifications exigées.

Pour chaque étape de la qualification, un protocole est rédigé, puis les essais sont réalisés et un rapport est émis puis validé.

3.5.3. Les étapes de la qualification initiale d'un équipement

La qualification passe, en règle générale, par quatre étapes :



<u>Etape 1 : Qualification de conception</u>

D'après les BPF, la QC est la « vérification documentée attestant que la conception proposée pour les installations, les systèmes et les équipements, convient pour l'objectif fixé. ». (55)

Lors de cette première étape, on vérifie la concordance entre le cahier des charges et ce que propose le fournisseur.

Le cahier des charges comprend plusieurs parties :

- Description du matériel,

- Objectifs,
- Enoncé du besoin,
- Exigences réglementaires,
- Exigences opérationnelles (délai et conditions de livraison, étalonnage, mise en service, programme de qualification…),
- Exigences générales (documentation, planning des opérations, sécurité, formation…),
- Cadre de réponse avec le prix, les coûts d'installation et de maintenance.

Etape 2 : Qualification d'installation

D'après les BPF, la QI est la « vérification documentée attestant que les installations, les systèmes et les équipements, tels qu'ils sont installés ou modifiés, sont conformes à la conception approuvée et aux recommandations du fabricant. ». (55)

Quel que soit l'équipement, la qualification d'installation se déroule lorsque l'équipement est à l'arrêt.

- Protocole de QI

Le protocole de QI, établi pour chaque élément du matériel ou des systèmes à valider, énumère le nom, la description, le modèle et les numéros d'identification, la localisation, les raccordements, les exigences d'exploitation et tout dispositif de sécurité du système/matériel devant être documenté. Il doit également vérifier la disponibilité de tous les plans, manuels, listes de pièces détachées du système ou équipement.

- Réalisation et rapport de la QI

Durant la réalisation des tests, chaque résultat est reporté par écrit sur des fiches de test, datées et signées par l'opérateur en charge de l'essai et par un vérificateur du service de qualification. A l'issue de chaque test, la conformité ou la non-conformité est déclarée, et des actions correctives sont entreprises en cas de non-conformité. Enfin, le rapport statut sur l'état de la qualification d'installation, et la conformité permettra le passage à l'étape suivante : la qualification opérationnelle.

Etape 3 : Qualification opérationnelle

D’après les BPF, la QO est la : « vérification documentée attestant que les installations, les systèmes et les équipements, tels qu’ils sont installés ou modifiés, fonctionnent comme prévu dans les gammes de fonctionnement escomptées. ». (55)

Lors de la QO, on va tester tous les témoins du fonctionnement en conditions normales, tous les points d’alerte, tous les interrupteurs et écrans, tous les témoins d’interaction et toute autre indication des mécanismes et du fonctionnement. Comme pour la QI, le protocole de QO définira les spécifications et des critères d’acceptation pour toutes les opérations.

Une fois la conformité de la qualification opérationnelle établie dans un rapport écrit, la qualification des performances du matériel ou système pourra être engagée.

Etape 4 : Qualification des performances

D’après les BPF, la QP est la : « vérification documentée attestant que les systèmes et les équipements sont capables de fonctionner efficacement et de manière reproductible d’après la méthode du procédé approuvée et les spécifications du produit ». (55)

Le protocole de QP décrit la ou les méthodes utilisées pour démontrer qu’un système ou qu’un élément donne uniformément les résultats requis et répond aux normes spécifiques lors d’une utilisation habituelle et, le cas échéant, dans les situations les plus défavorables. Comme précédemment, le protocole de QP comprend une description des procédures préliminaires requises, le détail des tests à effectuer et les critères d’acceptation pour chacun d’eux.

L’étude est basée sur les résultats de la qualification opérationnelle. Les paramètres et méthodes qui ont été définis lors de l’étape précédente seront mis en pratique à cette étape. Toutes les conditions requises en activité normale seront mises en application.

Le but est de déterminer si les résultats sont reproductibles et si des résultats positifs peuvent être obtenus à long terme. (56)

3.6 Vérification de la validité d'une validation

La validité de la validation doit être régulièrement vérifiée. Cette durée doit être définie selon plusieurs critères. Ceux-ci peuvent résulter par exemple :

- De l'estimation de l'influence de l'environnement,
- De la modification de composants ou d'équipement sensibles ou soumis à de fortes contraintes,
- Des risques résultants de modifications non détectées dans le processus.

Une revalidation peut s'avérer nécessaire en cas :

- De changements sur le produit, le matériau ou l'équipement,
- De changements d'exigences ou de spécifications,
- De changements dans l'environnement,
- Du changement de localisation,
- De réparations, changements de dispositifs ou de composants individuels dans le processus,
- D'autres changements dans le processus.

Une revalidation ne doit pas nécessairement être aussi complète que la validation initiale. Elle peut être limitée, selon le cas, aux aspects et influences qui ont changé ou qui ont été changés, ceci ayant été déterminé à l'issu d'une évaluation des risques. (56)

3.7 Conclusion

Toute entreprise pharmaceutique a pour objectif global l'obtention de produits surs, efficaces et de qualité requise. C'est en ce sens qu'intervient le système qualité englobant toutes les dispositions mises en œuvre pour obtenir cet objectif. La validation, et donc la qualification, font partie intégrante de la démarche qualité, en assurant des méthodes de fabrication fiables et reproductibles, conformément aux exigences du dossier d'AMM.

4. Méthodologie assurant la validation du procédé de stérilisation par autoclavage

4.1 Introduction

Le site de production de médicaments stériles Ceva, à Libourne, a fait la commande d'un nouvel autoclave pour stérilisation terminale, le précédent ayant été mis au rebut suite à la fin de sa garantie décennale. Pour tout nouvel équipement, une qualification initiale est nécessaire. Les autoclaves étant des équipements d'une grande importance sur un site de production en stérile, de nombreux tests sont à effectuer également en routine.

Vont être introduit, dans un premier temps, les principes de l'autoclave et de la stérilisation à la chaleur humide. Ensuite, nous proposerons un protocole délimitant la qualification initiale d'un autoclave pour stérilisation terminale. Le but est de bien encadrer la qualification afin de ne prendre aucun risque, et d'être assuré de la bonne efficacité de l'équipement. De plus, au vu du grand nombre de produits stérilisés dans l'autoclave, il est nécessaire pour une industrie de simplifier certains tests afin de perdre un minimum de temps et d'argent.

Après avoir établi le protocole de qualification de l'autoclave, il est indispensable de faire perdurer la validité de ces équipements grâce à des essais réguliers. En effectuant des recherches sur les différentes normes et textes relatifs à la stérilisation par autoclavage, nous pouvons nous rendre compte de l'inexistence d'un protocole type assurant la validation de routine. Les normes donnent bien des indications sur les tests et suggestions quant à leur fréquence mais le choix final est laissé à l'utilisateur de l'autoclave. L'objectif de ce travail est donc de créer une logique structurelle permettant d'obtenir un procédé fiable et reconnu.

4.2 La stérilisation à la chaleur humide

4.2.1. L'autoclave

Le premier prototype d'autoclave à vapeur, appelé le Digesteur, a été créé par Denis Papin, physicien et inventeur français, en 1679. L'invention du premier autoclave a été attribuée à un microbiologiste français, Charles Chamberland, en 1879. (57)

Un autoclave est un récipient à paroi épaisse et à fermeture hermétique, capable de résister à une pression élevée. Cet appareil va générer de la vapeur en continu en évacuant l'eau de condensation de façon à maintenir la pression et la température à des niveaux contrôlés. Ces paramètres sont contrôlés grâce à des capteurs placés à des endroits judicieux (notamment une sonde thermique à l'endroit le plus froid de l'enceinte). Les autoclaves sont qualifiés et utilisés pour leur capacité à instaurer des conditions homogènes à l'intérieur de l'enceinte et de la charge.

Un autoclave est constitué d'une chambre accueillant la charge à stériliser, et est connecté à plusieurs dispositifs :

- Un générateur de vapeur,
- Un dispositif de purge de la vapeur et des condensats,
- Une pompe à vide,
- Une arrivée d'air filtré (pour le retour à la pression atmosphérique en fin de cycle),
- Des dispositifs métrologiques (sondes de température, de pression, manomètre et thermomètre).

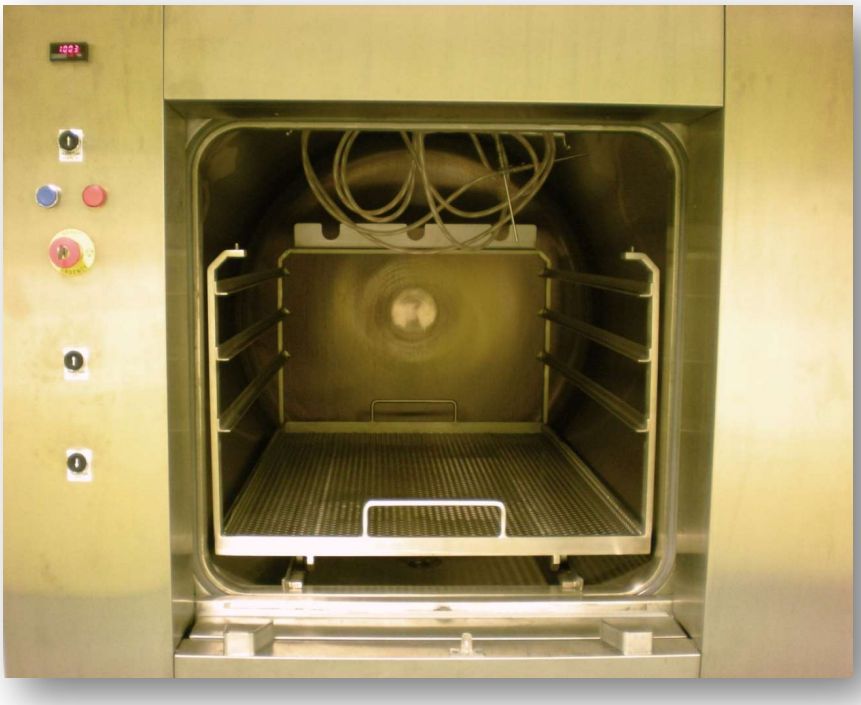


Figure 12. Un des autoclaves de production du laboratoire Ceva

Cet équipement permet de réaliser, sous pression, une stérilisation à la vapeur de différents types de matériels, tels que du matériel utilisé pour la répartition (bouchons, filtres …) ou des produits liquides contenus en récipient fermé (produits semi-finis, PSF). C'est pour ce dernier type de produit que l'autoclave pour stérilisation terminale entre en jeu.

D'après la ligne directrice 1 des BPF, concernant la fabrication des médicaments stériles, « la filtration seule - lors de la répartition - n'est pas considérée comme suffisante lorsqu'il est possible d'effectuer une stérilisation dans le récipient final ». Ce qui signifie que tous les produits, après avoir été répartis, s'ils sont résistants à la chaleur, seront stérilisés dans l'autoclave pour stérilisation terminale.

4.2.2. La stérilisation à la chaleur humide

De toutes les méthodes disponibles pour la stérilisation, la chaleur humide sous forme de vapeur saturée sous pression est la plus largement utilisée et la plus fiable. La stérilisation à la vapeur est non toxique, peu coûteuse, rapidement microbicide, sporicide, et chauffe et pénètre rapidement dans la charge.

Le principe de base de la stérilisation à la vapeur, tel que pratiqué dans un autoclave, consiste à exposer chaque article au contact direct de la vapeur à la température et à la pression requises pendant le temps spécifié. Ainsi, il existe quatre paramètres à contrôler pour la stérilisation à la vapeur : la vapeur, la pression, la température et le temps. (58)

L'action conjuguée de l'humidité et de la chaleur permet la dénaturation des protéines bactériennes par hydrolyse. Les molécules d'eau viennent former des liaisons hydrogènes avec les groupes C-O et N-H de protéines des microorganismes et déstabilisent ainsi leur conformation naturelle, inhibant les mécanismes de duplication moléculaire et entrainant *in fine* la mort dudit microorganisme. (11)

La pression sert à obtenir les températures élevées nécessaires pour tuer rapidement les germes. Des températures spécifiques doivent être obtenues pour assurer l'activité microbicide. Le temps minimum de stérilisation doit être mesuré à partir du moment où tous les matériaux à stériliser ont atteint la température requise. (59)

Pour procéder, la chambre d'autoclave est chargée avec les objets à stériliser selon un motif défini, préalablement déterminé. Une fois chargée, la chambre est scellée, puis l'air est éliminé et remplacé par de la vapeur. La chaleur de la vapeur tue les microorganismes, et l'efficacité de la stérilisation dépend à la fois du temps pendant lequel les articles sont exposés à la vapeur et de l'efficacité de la pénétration de la vapeur dans toutes les surfaces et espaces du produit.

4.2.3. Le cycle de stérilisation à la vapeur

Les différentes phases d'un cycle de stérilisation correspondent chacune à une nécessité précise et dédiée en fonction de chaque type de charge, sa géométrie, ses matériaux, ses emballages.

Le cycle type d'un autoclave se déroule comme suit :

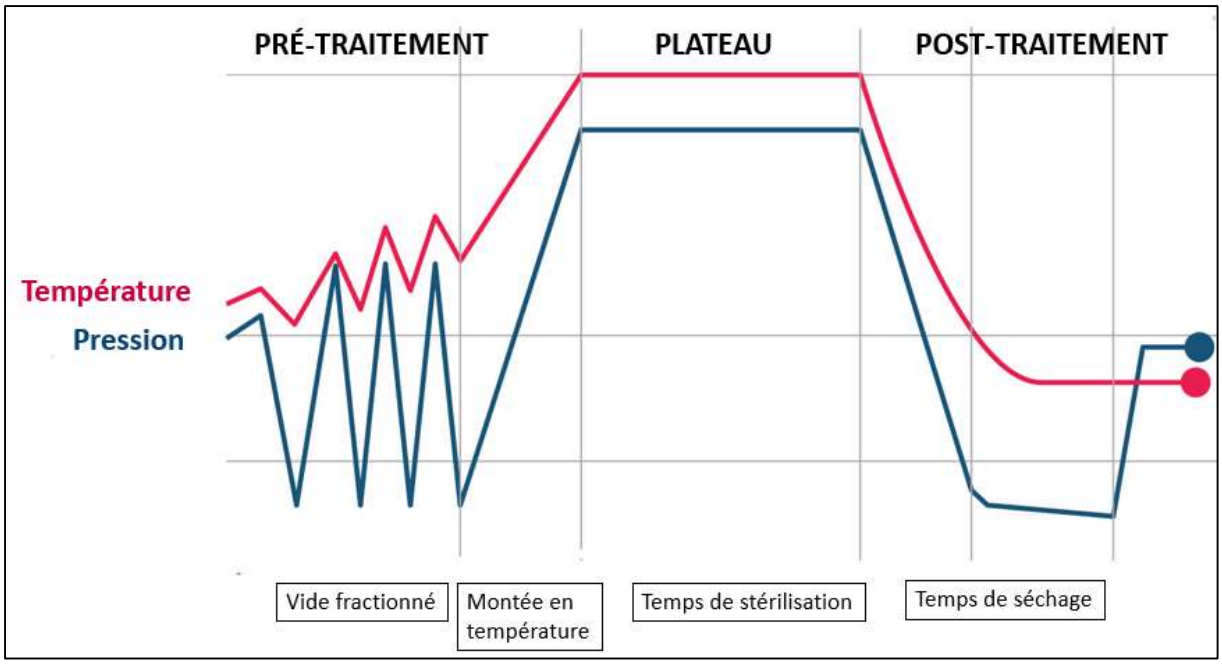


Figure 13. Schéma d'un cycle type de stérilisation à la vapeur (60)

- <u>Phase de prétraitement :</u>

Toute poche d'air se maintenant dans la charge se comporte comme un obstacle à l'action stérilisante de la vapeur d'eau et s'oppose à l'homogénéité de la température. C'est pourquoi une succession de vides et de réinjections de vapeur d'eau est réalisée, selon une séquence bien définie, de telle façon que la vapeur se substitue intégralement à l'air contenu dans la chambre et au cœur de la charge.

Cette phase préconditionne la charge avant l'étape suivante de stérilisation. (46)

- <u>Phase de montée en température et plateau de stérilisation :</u>

Après évacuation complète de l'air, la montée en pression de la vapeur saturée permet, après une période d'équilibrage, d'atteindre dans la chambre les valeurs guides préétablies de température et de pression et au matériel d'atteindre la température prescrite. Une fois cet équilibre atteint, débute la phase de stérilisation proprement dite durant laquelle le temps de stérilisation, appelé aussi temps de contact, est fixé. La température est maintenue en tout point de la charge. (30)

- Phase de post-traitement : refroidissement ou séchage et retour à la pression atmosphérique

La phase de post-traitement a pour rôle de rééquilibrer la température, la pression et l'hygrométrie intérieure avec les conditions ambiantes.

Généralement, les charges subissent un vide supérieur à 90% par rapport à la pression atmosphérique pendant une durée déterminée. Ceci permet de purger la chambre de la vapeur et de sécher la charge. Le retour à la pression atmosphérique se fait ensuite par admission de l'air ambiant dans l'enceinte, au travers d'un filtre. (46)

Pour les liquides, il est important d'effectuer une décompression progressive afin de ne pas faire exploser les flacons encore sous pressions. En effet, il existe un différentiel de pression : à la fin du plateau, la pression à l'intérieur des flacons est plus forte que celle de la chambre.

4.2.4. Loi d'inactivation des micro-organismes

Quel que soit le procédé de stérilisation, les lois qui régissent l'inactivation des microorganismes sont les mêmes. Au cours de la stérilisation, la concentration d'une population bactérienne obtenue à partir d'une souche pure, décroit de manière logarithmique en fonction du temps. (19)

La loi de décroissance du nombre de microorganismes en fonction du temps, à température constante, suit une décroissance exponentielle.

A partir du constat selon lequel la température et le temps influent sur la destruction des germes, deux lois ont été établies :

- 1ère loi : décroissance en fonction du temps (valeur D)

À une température donnée, le temps de réduction décimale D correspond au temps nécessaire à réduire la population de microorganisme d'un facteur 10. (3)

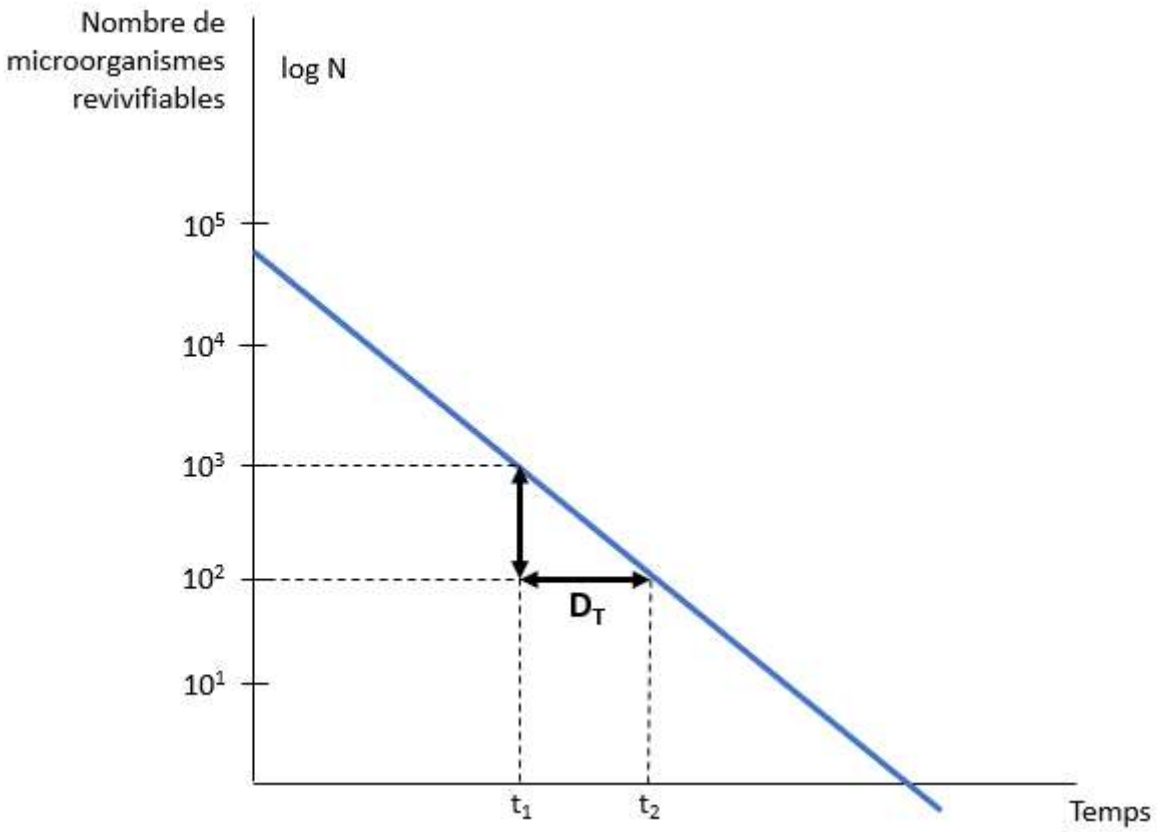


Figure 14. Représentation logarithmique de la décroissance en fonction du temps (61)

La destruction exponentielle des microorganismes en fonction du temps (à chaleur constante) peut s'écrire :

$$N = N0e^{-kt}$$

N : nombre de bactéries survivantes après un cycle de stérilisation
N_0 : nombre de bactéries au départ
k : constante de vitesse de la réaction
t : le temps d'exposition à l'agent stérilisant
Le signe - indique qu'il va s'agir d'une décroissance. (62)

- <u>2ème loi : décroissance en fonction de la température (valeur z)</u>

La valeur z correspond à l'élévation de température nécessaire pour réduire la valeur du temps de réduction décimale (valeur D) d'un facteur 10. Elle caractérise la résistance d'un

microorganisme aux variations de température. Plus on élève la température de traitement, plus le temps de réduction augmente (relation exponentielle).
La valeur de référence retenue est celle du *Bacillus stearothermophilus* qui vaut z=10°C.

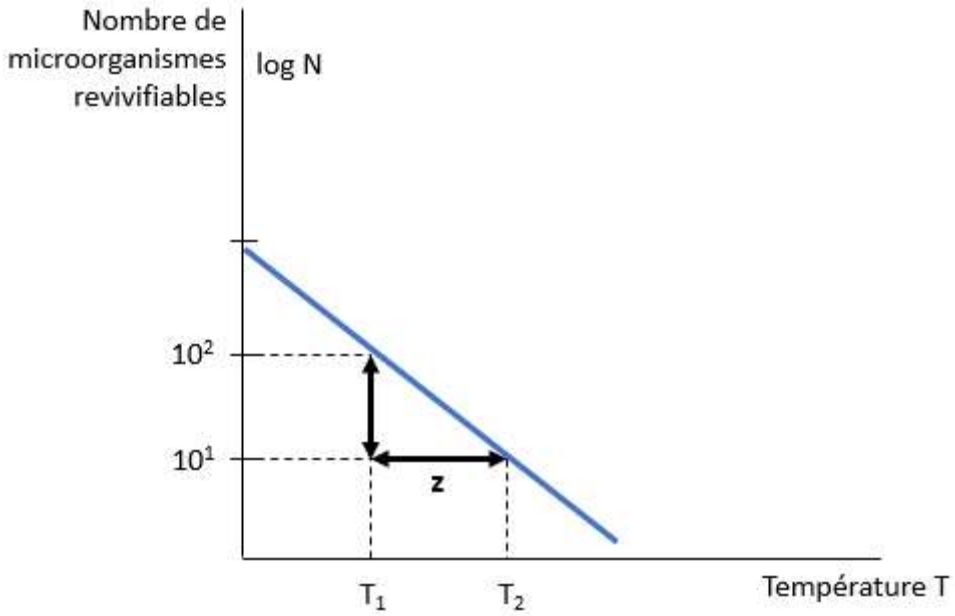


Figure 15. Représentation logarithmique de la décroissance en fonction de la température (61)

Si l'on reprend la formule de la 1ère loi, et qu'on l'applique en termes de température, la décroissance s'écrit :

$$N = N0e^{-k}$$

N : nombre de bactéries survivantes après un cycle de stérilisation
N_0 : nombre de bactéries au départ
k : constante de vitesse de la réaction
θ : la température d'exposition à l'agent stérilisant
Le signe - indique qu'il va s'agir d'une décroissance. (62)

Dans les deux cas, vu qu'il s'agit de relations exponentielles, on n'atteint jamais la valeur zéro bactéries restantes. Il reste toujours un petit nombre, si symbolique soit-il. Il existe donc toujours une probabilité non nulle qu'un microorganisme puisse survivre au procédé de stérilisation.

4.2.5. La valeur stérilisatrice F_0

Comment évaluer simultanément température et temps ? C'est le concept de valeur stérilisatrice qui a été développé par l'industrie américaine de la conserverie et qui a été étudiée en degrés Fahrenheit, d'où l'usage de la lettre F.

On part d'un paramètre non décrit jusqu'à présent : le taux de létalité L qui indique l'efficacité relative d'une stérilisation à une température donnée. Ce taux relatif découle des deux lois précédentes (temps et température). On prend comme référence l'efficacité de la stérilisation à 121°C pendant une minute, à laquelle on attribue un taux de létalité relatif de 1, donc une valeur stérilisatrice de 1 minute.

$$LTz = \frac{effet\ létal\ \text{à}\ la\ température\ T}{effet\ létal\ \text{à}\ la\ température\ de\ référence\ Tref}$$

La somme des effets stérilisants cumulés au cours du cycle de traitement représente la valeur stérilisatrice du traitement. On définit ainsi la valeur stérilisatrice F_T^z d'un traitement de stérilisation comme la somme des effets accumulés pendant chaque intervalle de temps Δt.

Cette valeur stérilisatrice est représentée par l'aire de la surface située sous la courbe L=f(t) ci-dessous :

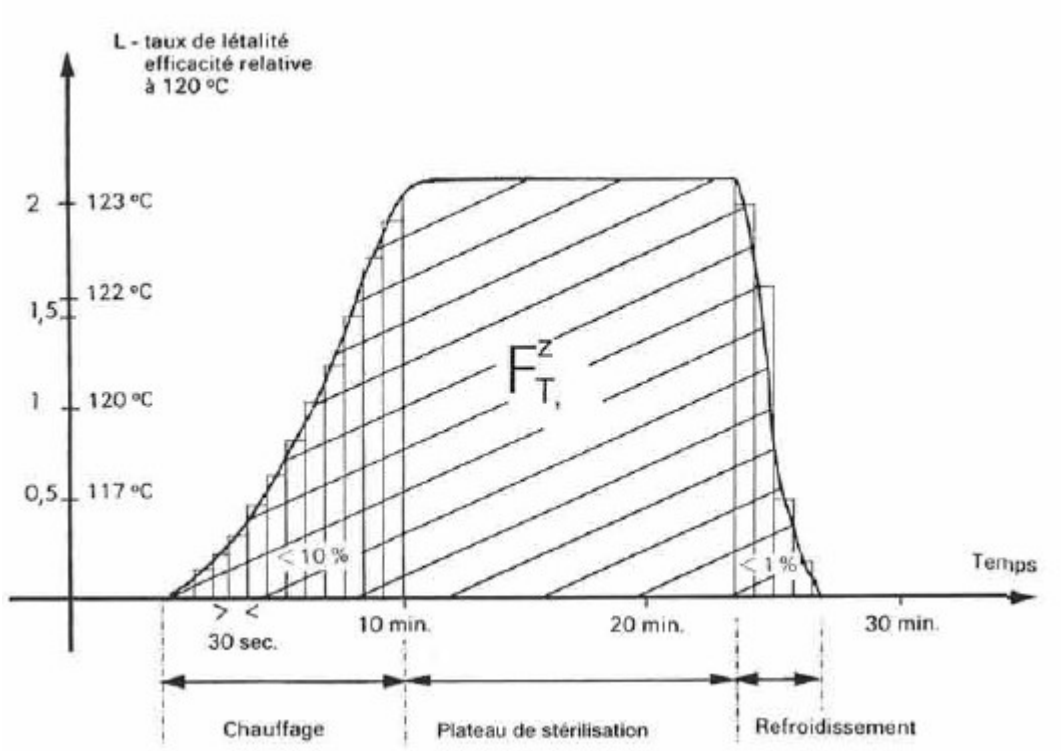


Figure 16. Variation du taux de létalité au cours d'un cycle thermique (11)

Que signifie F_0 ?

F_0 est le temps, en minutes, de la valeur stérilisatrice lorsque la température de référence est 250°F, c'est-à-dire 121,1°C et z=18°F ; c'est-à-dire 10°C.

$$F0^{18°F}_{250°F} = F^{10°C}_{121,1°C} \quad (11)$$

La valeur stérilisatrice F_0 permet donc de comparer l'efficacité thermique de traitements différents en rapportant tout aux conditions de référence (z=10°C, T=121,1°C). (63)

De façon plus simple, le terme "F_0" est défini comme le nombre de minutes équivalentes de stérilisation à la vapeur à 250 ° F (121,1 ° C) délivré à une charge. Par exemple, si un cycle a une valeur F_0 de 15, l'efficacité de stérilisation de ce cycle est égale à 15 minutes à 121,1 ° C, quelle que soit la température du procédé et le temps utilisé dans le cycle. (64)

Plusieurs combinaisons durée/température, reconnues par les pharmacopées, sont acceptables pour la stérilisation à la chaleur humide, notamment celles répertoriées dans le tableau 3, ci-dessous.

Tableau 3. Combinaisons durée/température acceptables pour la stérilisation à la chaleur humide (65)

Température (°C)	Temps (min)
121	15
126	10
134	3

4.2.6. Les témoins de stérilisation

On distingue deux types de témoins de stérilisation :

- Les témoins physico-chimiques : bande thermosensible. Ces indicateurs ont pour objectif d'évaluer l'efficacité du procédé au niveau de ses paramètres physico-chimiques. Il existe 6 classes différentes décrites dans la norme NF EN ISO 11140-1 « Stérilisation des produits de santé – Indicateurs chimiques – Partie 1 : exigences générales ».

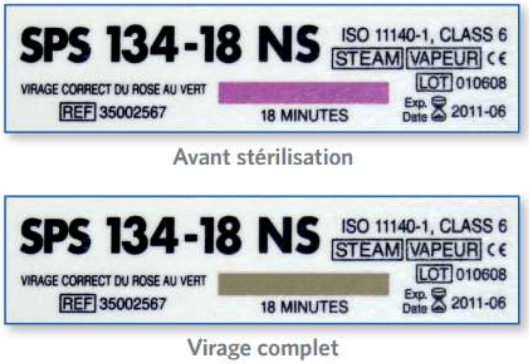


Figure 17. Exemple d'un indicateur physico-chimique de classe 6 avant et après stérilisation (66)

- Les témoins biologiques : ils contiennent une population standardisée de spores d'une espèce bactérienne appropriée. L'objectif de ces indicateurs est de démontrer que l'effet létal attendu est atteint, vis-à-vis d'une population connue de microorganismes référents.

Figure 18. Exemple d'indicateur biologique (67)

Geobacillus stearothermophilus, bactérie sporulante et très résistante à la chaleur, est le microorganisme le plus largement reconnu comme indicateur biologique pour la stérilisation par la chaleur humide. Les valeurs $D_{121°C}$ obtenues pour ses spores varient de 1,5 min à environ 4,5 min selon les conditions de sporulation, le matériau sur lequel les spores sont ensemencées, l'emballage primaire entourant le support ensemencé et l'environnement de stérilisation. (1)

Le développement d'un procédé de stérilisation doit inclure une évaluation de la charge ainsi que du produit à stériliser, afin de déterminer l'emplacement le plus défavorable, le plus inaccessible à l'agent stérilisant. Les indicateurs doivent être placés aux niveaux de ces emplacements pour prouver l'efficacité de la stérilisation.

4.3 Les cycles de stérilisation de l'autoclave sur le site de production Ceva

La partie production de Ceva à Libourne possède quatre autoclaves destinés à différentes utilisations :

- Un autoclave destiné à l'atelier de lyophilisation
- Un autoclave destiné à la répartition des produits dans leur récipient final
- Un autoclave destiné à l'atelier de fabrication des solutions
- Un autoclave destiné à stériliser les produits dans leur récipient final (Produits Semi-Finis)

L'*Annexe 1* présente les paramètres de stérilisation de chaque autoclave de l'usine Ceva.

Les trois premiers autoclaves cités ont une validation déjà en place, et le dernier autoclave pour stérilisation terminale doit être remplacé, et une qualification initiale est donc nécessaire. Nous allons donc voir en détail cet autoclave.

Il y a, au total, neuf produits différents stérilisés dans cet autoclave pour stérilisation terminale, dont certains avec différents formats de flacons. Trois cycles différents ont été programmés spécialement pour ces produits sur l'ancien autoclave.

Tableau 4. Paramètres de stérilisation des cycles et produits concernés

N° CYCLE	CARACTERISTIQUES	PRODUITS	FORMAT (ml)
1	Vide 150 mbar Température de stérilisation : 121°C Durée de stérilisation : 15 min Refroidissement 50°C	PRODUIT A	20
			50
			100
2	Vide 150 mbar Température de stérilisation : 121°C Durée de stérilisation : 15 min Refroidissement 70°C	PRODUIT B	10
			25
			100
		PRODUIT C	10
			50
		PRODUIT D	5
		PRODUIT E	32
		PRODUIT F	10
		PRODUIT G	10

3	Vide 150 mbar Température de stérilisation : 121°C Durée de stérilisation : 30 min Refroidissement 70°C	PRODUIT H	10
		PRODUIT I	100

N.B. Le refroidissement s'effectue par introduction d'eau glacée dans la double enveloppe et par injection d'air comprimé filtré. Le « refroidissement 70°C » indique que l'ouverture de la porte de l'autoclave ne peut se faire que si la température de la chambre se situe en dessous de 70°C.

4.4 Détermination du produit « worst-case »

D'après les BPF, le « pire cas » ou « worst case » est la « condition ou ensemble de conditions englobant les circonstances et les limites opérationnelles supérieures ou inférieures, dans les limites des procédures opératoires, comportant le plus grand risque de défaillance du produit ou du procédé comparé aux conditions idéales ». (55)

Afin de faciliter le travail de validation (dont la qualification), il est avantageux d'utiliser cette approche afin de ne qualifier qu'une famille de produits et non tous les produits, car comme le montre le tableau 4, l'autoclave pour stérilisation terminale fonctionne pour de multiples flacons et différentes recettes.

Pour gagner du temps et rédiger tous les protocoles avant l'arrivée du nouvel autoclave, nous avons travaillé avec l'ancien autoclave, en partant du principe que les produits ont un comportement similaire d'un autoclave à un autre.

La norme NF ISO 17665-2 (« Stérilisation des produits de santé - Chaleur humide – Directives relatives à l'application de l'ISO 17665-1[5] ») précise qu' « un produit contenu[6] se caractérisera par sa formulation, son volume, et sa viscosité. Son conteneur pourra se caractériser par sa taille, son matériau et son dispositif de fermeture. » (65)

Le but est donc de déterminer quels produits sont les plus critiques pour chaque cycle en tenant compte :

- Du matériau du conteneur : le type de verre employé,
- Du dispositif de fermeture du conteneur : bouchon et capsule (identique pour tous les produits),
- De la taille du conteneur : format du flacon,
- Du volume nominal du produit contenu,
- De la formulation du produit contenu : principe actif,
- De la viscosité du produit contenu.

[5] Norme ISO 17665-1 : Exigences pour le développement, la validation et le contrôle de routine d'un procédé de stérilisation des dispositifs médicaux

[6] Un produit contenu est un « produit pour lequel le milieu régnant à l'intérieur du stérilisateur à tout moment du procédé de stérilisation n'entre pas en contact direct avec le produit ». (68)

La détermination du worst case, pour chaque cycle de stérilisation en place sur l'ancien autoclave, va nous permettre de réaliser la qualification seulement sur ce produit sur le nouvel autoclave. La validation du worst-case induit la validation de tous les autres produits de criticité inférieure, cela va donc être un gain de temps et d'argent pour l'entreprise.

Tout d'abord, il faut les caractéristiques de chaque produit, ce qui nous amène au tableau 5 :

Tableau 5. Caractéristiques des produits à autoclaver

N° CYCLE	CARACTERISTIQUES	PRODUITS	VOL NOMINAL (mL)	FORMAT FLACON (mL)	VERRE	% EAU
1	Vide 150 mbar Température de stérilisation : 121°C Durée de stérilisation : 15 min Refroidissement 50 °C	PRODUIT A	21,5	20	Incolore	60,9
			52	50		
			102,5	100		
2	Vide 150 mbar Température de stérilisation : 121°C Durée de stérilisation : 15 min Refroidissement 70°C	PRODUIT B	10,5	10	Incolore	100
			21	25		
			81	100		
		PRODUIT C	10,8	10	Incolore	99,1
			51	50		
		PRODUIT D	2	5	Incolore	71,4
		PRODUIT E	26	32	Incolore	98,4
		PRODUIT F	10,5	10	Jaune	98,5
		PRODUIT G	10,8	10	Incolore	84,5
3	Vide 150 mbar Température de stérilisation : 121°C Durée de stérilisation : 30 min Refroidissement 70°C	PRODUIT H	10,8	10	Incolore	81,0
		PRODUIT I	102	100	Incolore	16,5

Remarques :

- Le pourcentage d'eau dans chaque produit reflète sa viscosité : moins il y a d'eau, plus le produit est généralement visqueux.
- Pour le produit F contenu dans un flacon de couleur jaune, nous testerons ce type de flacon avec de l'eau à l'intérieur afin de voir l'impact de type de verre sur l'efficacité de la stérilisation.
- Pour les produits se déclinant en trois formats (les produits A et B), nous ne testerons que les formats extrêmes, qui englobent le format intermédiaire.

Protocole de mise en œuvre :

- Placer un flacon de chaque produit/format à tester (d'après le tableau 5), au centre de l'autoclave
- Ajouter un thermocouple à l'intérieur de chaque produit, de façon hermétique (bouchon percé pour faire passer le thermocouple et refermé grâce à du ruban adhésif autoclavable)
- Lancer le cycle correspondant aux produits (cycle n° 1, 2 ou 3)

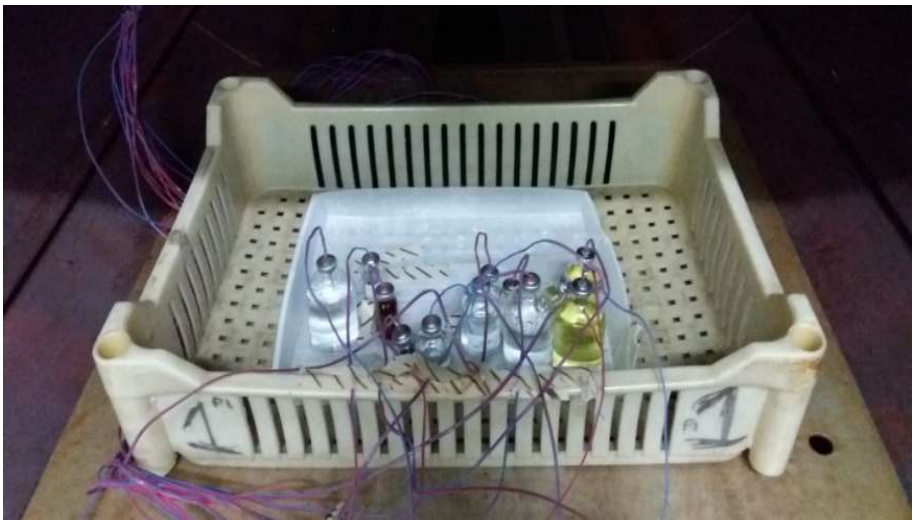


Figure 19. Produits à stériliser avec les thermocouples à l'intérieur

Chaque cycle est répété trois fois et les produits changés de position afin de tester la reproductibilité.

- Identifier la valeur stérilisatrice F_0 minimum en fin de plateau de stérilisation, et le produit auquel elle appartient, pour chaque cycle

Plus la valeur F_0 est faible, plus le produit est critique en termes de stérilisation, car il met plus de temps à monter en température. C'est pour cette raison que nous avons choisi ce critère-là.

Analyse des résultats et détermination du worst-case du cycle 3 :

Deux produits sont autoclavés grâce à la recette n°3 :

- Le produit H de 10 ml
- Le produit I de 100 ml

Le produit I étant peu riche en eau (16,5% d'eau d'après le tableau 5), nous décidons de tester simultanément un flacon (du même type de verre que le produit I) avec de l'eau PPI.

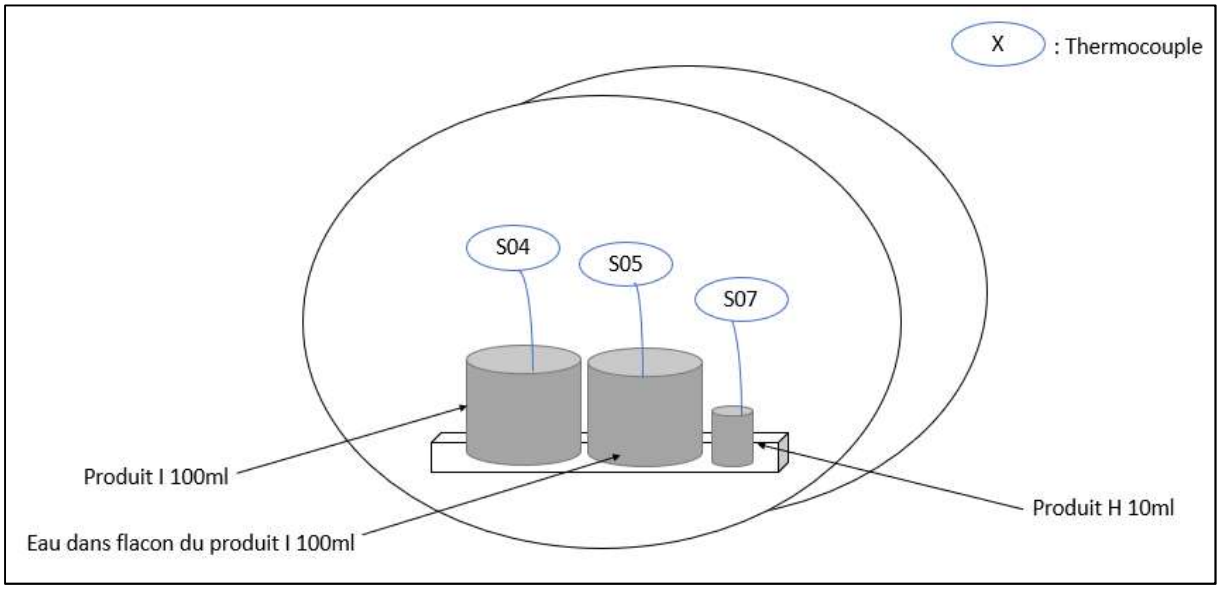


Figure 20. Schéma de l'emplacement des sondes et des produits dans la chambre de l'autoclave pour le premier essai

Tableau 6. Résultats des F_0 obtenus en fin de plateau, pour le 1er essai

N° sonde	Produit	Format	F0
S04	Produit I	100 ml	23,57
S05	Flacon d'eau	100 ml	24,79
S07	Produit H	10 ml	27,55

Tableau 7. Résultats des F_0 obtenus en fin de plateau, pour le 2e essai

N° sonde	Produit	Format	F0
S04	Produit I	100 ml	22,04
S05	Flacon d'eau	100 ml	23,78
S07	Produit H	10 ml	27,30

Tableau 8. Résultats des F_0 obtenus en fin de plateau, pour le 3e essai

N° sonde	Produit	Format	F0
S04	Produit I	100 ml	22,87
S05	Flacon d'eau	100 ml	24,80
S07	Produit H	10 ml	28,38

Conclusion : Le PRODUIT I ressort critique pour chaque essai, son F_0 est le plus faible à la fin du plateau de stérilisation, quelle que soit la position des flacons dans la panière. Il est le produit critique du cycle n°3.

Le flacon d'eau de 100 mL est le deuxième plus critique derrière le Produit I 100 mL avec un écart de F_0 de + 1,9 minutes maximum en fin de plateau de stérilisation ; cette valeur est faible mais on peut dire que le principe actif ou bien la viscosité du produit a eu un impact sur la pénétration de la chaleur dans le flacon.

A l'issue des essais, nous avons clairement pu identifier les produits les plus critiques, qui avaient la valeur stérilisatrice F_0 la plus basse, et ces résultats ont été reportés dans un rapport.

Un exemple de graphique montrant la montée du F_0 au cours du temps de chaque produit est joint en *Annexe 2*.

Ce test a démontré que les produits les plus critiques pour chaque cycle sont :

- Le produit A de 100 ml pour le cycle n°1
- Le produit B de 100 ml pour le cycle n°2
- Le produit I de 100 ml pour le cycle n°3.

Finalement, on se rend compte que plus le volume du flacon est important, plus le F_0 est faible, ce qui est finalement logique puisqu'il y a plus de produit à chauffer.

Tableau 9. Identification des produits critiques pour chaque cycle de stérilisation

N° CYCLE	CARACTERISTIQUES	PRODUITS	FORMAT (ml)
1	Vide 150 mbar Température de stérilisation : 121°C Durée de stérilisation : 15 min Refroidissement 50°C	PRODUIT A	20
			50
			100
2	Vide 150 mbar Température de stérilisation : 121°C Durée de stérilisation : 15 min Refroidissement 70°C	PRODUIT B	10
			25
			100
		PRODUIT C	10
			50
		PRODUIT D	5
		PRODUIT E	32
		PRODUIT F	10
		PRODUIT G	10

3	Vide 150 mbar Température de stérilisation : 121°C Durée de stérilisation : 30 min Refroidissement 70°C	PRODUIT H	10
		PRODUIT I	100

Nous verrons l'utilisation réelle de cette approche lors de la qualification initiale de l'autoclave, détaillée ci-après.

4.5 La qualification initiale de l'autoclave pour stérilisation terminale

Comme on l'a vu dans la partie 3, la qualification est un cheminement de plusieurs étapes, effectuées dans un ordre précis. Dans cette partie, nous allons suivre les étapes préconisées par les normes tout en allant plus loin en optimisant certains tests et en ajoutant d'autres afin d'être certain de la conformité de la stérilité obtenue.

4.5.1. Qualification de conception

Lors de la QC, on élabore le cahier des charges du nouvel autoclave avec les spécifications fonctionnelles, notamment décrites dans la norme NF EN 285 « Stérilisation – stérilisateurs à la vapeur d'eau – Grands stérilisateurs », par exemple :

- Volume de la chambre d'au moins 60 litres
- Impossibilité d'ouvrir la porte du stérilisateur durant un cycle
- S'il y a admission d'air dans la chambre pendant la phase de post-traitement, l'air doit être filtré
- Système d'enregistrement des données de chaque cycle de stérilisation
- Etc. (69)

On vérifiera que le fabricant dudit autoclave respecte bien toutes les spécifications demandées.

D'autres documents, comme les plans de construction de l'appareil, pourront être fournis par le fabricant à l'utilisateur. Ils vont permettre de préparer le local adéquat à l'arrivée de l'autoclave : surface nécessaire, raccord aux différentes utilités etc.

Tous ces documents sont reçus avant l'installation propre de l'autoclave. Ils permettent, entre autres, de préparer correctement son arrivée et de s'organiser (travaux à réaliser, utilités à apporter dans la zone etc.).

4.5.2. Factury Acceptance Test

La FAT ou test d'acceptation en usine est une étape supplémentaire mais non obligatoire, qui permet pour les équipements critiques tels que les autoclaves, d'être certain que le matériel est prêt à être installé et qu'aucune modification n'est à prévoir. Elle assure un gain de temps pour l'installation et la validation à venir.

Ces tests se déroulent chez le fabricant de l'autoclave, après sa conception finale, et en présence de l'équipe de qualification. Pendant cette FAT, on va réaliser quelques tests issus du protocole de QI/QO.

Par exemple, on va vérifier le bon fonctionnement du système de pilotage et de fonctionnement, vérifier la conformité de la machine avec les spécifications demandées, analyser la documentation technique etc.

4.5.3. Qualification d'installation

Comme on l'a vu dans la partie 3.5.3, la QI se déroule lorsque l'autoclave est à l'arrêt.

Pour la qualification de cet autoclave, les protocoles de QI et de QO sont fournis par le fournisseur de l'autoclave, puis vérifiés et approuvés par le service Assurance Qualité de Ceva. Les tests sont réalisés par le fournisseur sous la supervision du service Qualification Ceva.

- Protocole de QI

Le protocole de QI est rédigé et approuvé avant la réalisation de la qualification même. Le protocole de QI doit décrire l'équipement dans son ensemble et comporte :

- Le nom de l'équipement,
- La marque,
- Le type,
- Le fournisseur,
- Le numéro de série,
- L'année de fabrication,
- La localisation de l'équipement avec notamment l'emplacement du bâtiment,

- La fonction de l'équipement,
- Les tests à effectuer pour la QI avec leurs objectifs, le protocole de mise en œuvre et enfin les critères d'acceptation.

- Réalisation de la QI

Lors de la QI, on va vérifier avec le fournisseur :

- La présence de la documentation : manuel d'utilisation et de maintenance de la machine, les schémas électriques, les fiches techniques… ;
- La présence des utilités : l'alimentation électrique, la vapeur d'eau, l'eau et l'air comprimé ;
- Les étalonnages des sondes de température et de pression installées sur l'autoclave ;
- La présence et l'identification des composants de l'autoclave par rapport au PID (Piping Instrumentation Diagram, c'est-à-dire le schéma tuyauterie et instrumentation) mais aussi identification du capteur de pression, du type de sondes de température… ;
- La conformité des raccordements électriques et pneumatiques avec une vérification fil à fil.

- Rapport de QI

Le rapport va statuer sur l'état de conformité de cette qualification d'installation. Si la conclusion est positive et la QI validée, on pourra passer à la qualification opérationnelle.

4.5.4. Qualification opérationnelle

La qualification opérationnelle se déroule lorsque l'autoclave est en marche et à vide (sans aucun produit à l'intérieur).

- Protocole de QO

Comme le protocole de QI, le protocole de QO va décrire l'équipement et ses fonctions puis donner les objectifs, le protocole de mise en œuvre ainsi que les critères d'acceptation de chaque test spécifique à la QO d'un autoclave. Ce protocole mis à disposition par le fournisseur de l'autoclave doit être vérifié par le service de Validation/Qualification de Ceva qui peut également y ajouter des tests si nécessaire.

- Réalisation de la QO

La QO est réalisée par le fabricant de l'autoclave sous la supervision du service Qualification. Les textes réglementaires, comme la norme NF ISO 17665, donnent des spécifications quant aux tests à réaliser lors de la QO.

A ces exigences réglementaires, on va ajouter d'autres tests jugeant les paramètres critiques du procédé de stérilisation. Ces ajouts résultent d'un questionnement entre les différents services de production, selon l'expérience acquise avec d'autres autoclaves, mais aussi de conseils donnés par les inspecteurs de l'Agence Nationale de SÉcurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES).

Les essais que préconise cette norme comprennent :

- Une vérification de la mise en fonctionnement (marche/arrêt) ;
- Une vérification de l'enchainement des étapes de chaque cycle de stérilisation et vérification de l'impression de ces cycles ;
- Des tests de simulation d'événements : coupure électrique, panne de vapeur, coupure de l'air comprimé… ;
- Une vérification des systèmes de sécurité (boutons d'arrêt d'urgence par exemple) ;
- Une vérification des entrées/sorties sur les schémas électriques et pneumatique ;
- Une vérification de l'automate de l'autoclave : vérification des droits d'accès, vérification de l'audit trail … ;
- Un test d'étanchéité ;
- Vérification de la bonne pénétration de la vapeur ;
- Une cartographie de l'autoclave en température ;
- Vérification de la qualité de la vapeur.

Pour vérifier la qualité de la vapeur on contrôlera la corrélation pression/température grâce à la table de Regnault.

Essais ajoutés en complément de la norme :

Pour cette QO effectuée en présence du fabricant, nous décidons d'ajouter un essai prouvant la bonne efficacité du procédé de stérilisation. Deux tests peuvent être envisagés :

- Test d'efficacité de la stérilisation sur flacons remplis d'eau
- Test d'efficacité de la stérilisation à vide par challenge microbiologique

À la fin de la QO, l'entreprise accepte la réception de l'équipement d'un point de vue commercial. Pour cette raison, il est important d'ajouter des tests, si on le juge nécessaire, à un protocole de qualification classique. La QP, effectuée sur un autoclave en charge et ayant pour objectif de prouver que le procédé est fiable, n'est pas effectuée en présence du fabricant, c'est pour cette raison que l'on complète cette QO par des essais de stérilité sur un autoclave rempli de flacons.

L'autre test permet également de vérifier la bonne efficacité de stérilisation mais sur un autoclave à vide. Cela ajoute une vérification supplémentaire à notre QO : des ampoules contaminées de germes devront ressortir stériles de l'autoclave (nous verrons ce test en détail par la suite).

Le nouvel autoclave est doté d'un nettoyage en place et d'une stérilisation en place, qui seront également à contrôler.

Afin de faciliter la compréhension de cette qualification, nous allons détailler les tests spécifiques à l'autoclave, ainsi que leurs critères d'acceptation, définis dans la norme NF EN 285 « Stérilisation -Stérilisation à la vapeur d'eau – Grands stérilisateurs ».

<u>Test d'étanchéité</u>

Le test d'étanchéité ou test de vide permet de vérifier que l'appareil est bien étanche à une certaine pression, afin de s'assurer qu'il n'y aura pas de recontamination après stérilisation (lors de l'ouverture des vannes par exemple).

- Critère d'acceptation : on tire au vide pendant 10 minutes, et le taux de montée en pression ne doit pas être supérieur à 0,13 kPa/min (ou 1,3 mbar/min).

<u>Test de pénétration de la vapeur : Test de Bowie Dick</u>

Le test de Bowie Dick permet de vérifier la bonne pénétration de la vapeur dans l'autoclave. Il permet de s'assurer de l'efficacité de la pompe à vide : purge totale de l'air et pénétration de la vapeur saturée au sein du paquet test. Le paquet d'essai doit répondre à la norme NF EN 285 « Stérilisation – Stérilisateurs à la vapeur d'eau – Grands stérilisateurs ». Le test de Bowie Dick s'effectue le plus souvent grâce à un cycle de stérilisation de 3,5 minutes à une température comprise entre 134°C et 137°C.

- Critère d'acceptation : l'indicateur doit présenter un changement de couleur uniforme dans sa totalité :

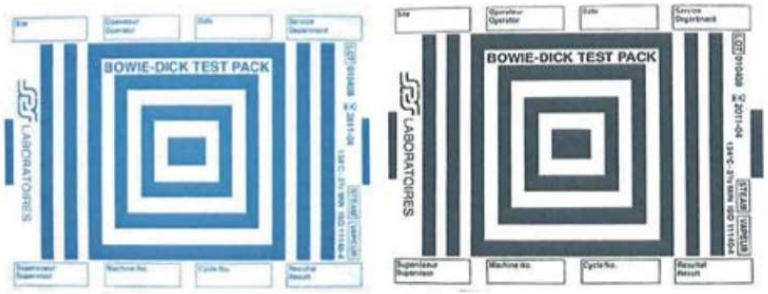


Figure 21. Exemple de changement de couleur uniforme sur un test de Bowie Dick (70)

<u>Cartographie de l'autoclave en température</u>

Ce test permet de vérifier l'homogénéité en température au cours du temps. Il est effectué trois fois, et à vide, en mesurant la température en différents points de l'autoclave selon un schéma bien défini.

- Critères d'acceptation :
  - Entre 0 et +3°C de la température de stérilisation spécifiée pour le cycle
  - Chaque capteur ne doit pas varier de plus de 1°C durant la phase du plateau
  - Les capteurs ne diffèrent pas les uns des autres de plus de 2°C à un temps t donné.

Ces mesures sont effectuées à l'aide de thermocouples (ou capteurs de température) reliés à une centrale d'acquisition (de la marque KAYE) permettant d'enregistrer et collecter les données. Cet appareil permet également de calculer en temps réel la valeur stérilisatrice F_0 à partir des températures enregistrées.

Les différentes normes préconisent l'utilisation de douze thermocouples pour un grand stérilisateur. Ces thermocouples sont disposés de façon homogène, aux endroits connus comme étant les plus critiques : à chaque coin de la chambre, au centre et mais aussi à proximité de la sonde de température interne à l'autoclave.

N.B. Les thermocouples utilisés sont étalonnés avant la validation.

Corrélation pression/température

Le contrôle de la qualité de la vapeur saturée repose sur la relation « pression-température » du diagramme de Regnault. Au plateau de stérilisation, la vapeur doit présenter une température qui correspond à sa pression de vapeur théorique.

Les conditions de stérilisation spécifiées doivent être fondées sur un rapport temps-température reconnu :

Tableau 10. Extrait de la table de Regnault (30)

Pression effective	Pression absolue	Température	Pression effective	Pression absolue	Température
Bar	Bar	°C	Bar	Bar	°C
1,00	2,013	120,42	2,00	3,013	133,69
1,05	2,063	121,21	2,05	3,063	134,25
1,10	2,113	121,96	2,10	3,113	134,82
1,15	2,163	122,73	2,15	3,163	135,36
1,20	2,213	123,46	2,20	3,213	135,88
1,25	2,263	124,18	2,25	3,263	136,43
1,30	2,313	124,90	2,30	3,313	136,98

Vérification de la valeur stérilisatrice F_0

Ce test est effectué avec un autoclave rempli de flacons d'eau Pour Préparations Injectables (Eau PPI) (même si, je le répète, la QO se fait normalement à vide). Ce test est mené trois fois sur chaque cycle grâce à douze thermocouples placés chacun dans un flacon (le logiciel de la centrale d'acquisition KAYE calculant les valeurs stérilisatrices F_0 en temps réel).

- Critère d'acceptation : F_0 > 15 minutes pour chaque flacon d'eau PPI

Pour information, les GMP (bonnes pratiques de fabrication aux Etats-Unis) exigent un F_0 supérieur ou égal à 12 minutes, et les BPF, un F_0 supérieur ou égal à 15 minutes. Dans notre cas, les cycles ont déjà été mis en place sur l'ancien autoclave il y a une dizaine d'années, et ce critère d'acceptation a déjà été validé, donc nous resterons avec cette exigence de F_0 supérieur à 15 minutes pour chaque cycle.

Les flacons utilisés représentent les produits les plus critiques de chaque cycle, établis lors de la détermination du worst case, expliquée plus haut : flacons incolores de 100ml.

Vérification de la stérilisation par challenge microbiologique

Ce test est effectué sur l'autoclave à vide, trois fois pour chaque cycle. Il permet de vérifier

l'efficacité de la stérilisation lorsque l'autoclave est vide. Douze indicateurs biologiques (ampoules contaminées à 10^6 germes de *Geobacillus stearothermophilus*) sont placés selon un schéma défini à chaque coin de la chambre :

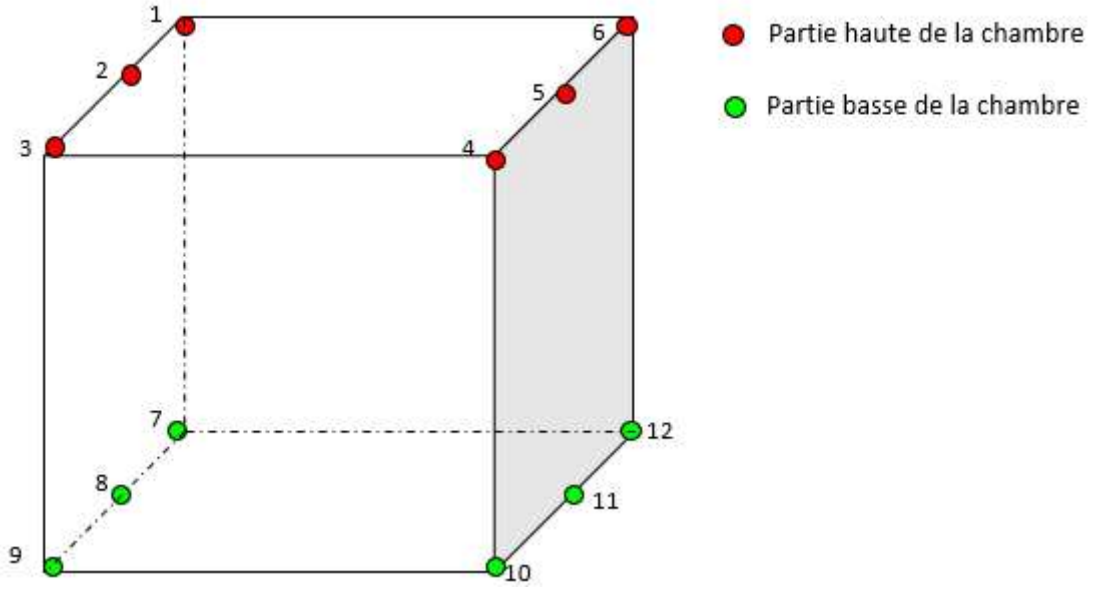


Figure 22. Schéma de l'emplacement des indicateurs biologiques

À la suite du cycle de stérilisation, les indicateurs biologiques sont récupérés dans des poches stériles puis placés dans un milieu nutritif Trypticase Soja dans le laboratoire de Contrôle Qualité du site Ceva. Un tube témoin négatif et un tube témoin positif sont également préparés.

Le tube témoin négatif (milieu de culture identique aux indicateurs biologiques mais non ensemencé) apporte la preuve que le milieu de culture a bien été stérilisé et peut également servir de référentiel couleur. Le tube témoin positif (indicateur biologique n'ayant pas suivi le cycle de stérilisation) apporte la preuve que toutes les conditions nécessaires à la pousse bactérienne sont réunies.

- Critère d'acceptation :
  - Absence de pousse bactérienne après 48h d'incubation à 55°C pour chaque indicateur biologique et pour le témoin négatif
  - Trouble du milieu nutritif pour le témoin positif

Vérification du nettoyage en place

Le nouvel autoclave étant doté d'un nettoyage en place, nous allons effectuer un test prouvant la conformité de ce paramètre. Il s'agit d'un test à la Riboflavine, procédé de contrôle qui à l'aide de la Riboflavine, substance fluorescente, montre l'efficacité du nettoyage. La solution de Riboflavine est dispersée à l'intérieur de l'autoclave, surtout aux endroits où il y a des raccords et des ouvertures, avant de lancer le nettoyage en place.

- Critère d'acceptation : si le nettoyage a été efficace, il ne restera aucun résidu de riboflavine dans l'autoclave lors du contrôle à la lampe ultra-violet.

Vérification de la stérilisation en place

Le nouvel autoclave est doté d'une stérilisation en place au niveau de la boucle entre la chambre et l'arrivée d'air comprimé, où un filtre purge l'arrivée d'air. Afin de vérifier cette fonctionnalité, on va placer des indicateurs biologiques (*Geobacillus stearothermophilus*) à cet endroit-là et vérifier qu'aucune pousse bactérienne n'est constatée après 48h d'incubation à 55°C.

4.5.5. Qualification de performances

La QP se déroule lorsque l'autoclave est en marche et en charge. Les tests se font soit avec chaque produit stérilisé en routine, s'ils sont peu nombreux, soit avec une famille de produits jugée comme la plus défavorable, dans des conditions normales de fonctionnement.

C'est donc à ce moment-là que la détermination du worst case nous sera grandement utile. D'après la norme NF EN ISO 17665-1, « la QP doit comprendre une série d'au moins trois expositions consécutives de la charge de stérilisation au procédé de stérilisation, qui démontre la conformité avec la spécification du procédé de stérilisation et la reproductibilité dudit procédé ». (68)

Si on reprend notre tableau avec les produits les plus critiques par cycle :

N° CYCLE	CARACTERISTIQUES	PRODUITS	FORMAT (ml)
1	Vide 150 mbar Température de stérilisation : 121°C Durée de stérilisation : 15 min Refroidissement 50°C	PRODUIT A	20
			50
			100

2	Vide 150 mbar Température de stérilisation : 121°C Durée de stérilisation : 15 min Refroidissement 70°C	PRODUIT B	10
			25
			100
		PRODUIT C	10
			50
		PRODUIT D	5
		PRODUIT E	32
		PRODUIT F	10
		PRODUIT G	10
3	Vide 150 mbar Température de stérilisation : 121°C Durée de stérilisation : 30 min Refroidissement 70°C	PRODUIT H	10
		PRODUIT I	100

Sans l'approche worst-case, nous aurions dû lancer trois cycles pour chaque charge (il y a 14 charges en tout : 9 produits différents dont 2 avec 3 volumes différents et 1 avec 2 volumes différents), donc 14 x 3 = 42 cycles.
Grâce à l'approche worst-case, nous n'avons besoin de lancer que 9 cycles (3 x 3 fois chaque produit critique), apportant un gain de temps (un cycle entier peut durer jusqu'à 8h), et un gain d'argent (les produits utilisés en qualification ne sont bien évidemment non libérables à la consommation).

Afin de démontrer que le procédé de stérilisation est capable d'atteindre un niveau prédéterminé d'assurance de la stérilité pour la charge concernée, et ce de manière répétée, plusieurs tests sont effectués :

- **Deux tests évaluant la bonne efficacité de la stérilisation :**
  - **Vérification de la valeur stérilisatrice F_0**, 3 fois en charge maximale (autoclave rempli de flacons)
  - **Vérification de la stérilisation grâce à des indicateurs biologiques**, 3 fois en charge maximale
- **Evaluation de la siccité de la charge**, 3 fois

Toujours dans un souci de fournir une qualité exemplaire, deux essais de stérilité sont effectués : le premier donne la preuve de la bonne stérilisation grâce à une formule mathématique (valeur stérilisatrice F_0), l'autre prouve la stérilité par challenge microbiologique.

L'explication de ces différents tests est détaillée ci-dessous :

Vérification de la valeur stérilisatrice F_0

Pour ce test, on utilise la centrale d'acquisition incluant le logiciel qui calcule en temps réel la valeur stérilisatrice F_0, reliée à des thermocouples placés comme pour la distribution thermique vu en QO (à chaque coin de la chambre, près de la sonde de température de l'autoclave et au centre de la chambre).

Les produits à stériliser ici sont des produits contenus, donc nous devons également vérifier l'efficacité de la stérilisation au sein de ceux-ci. C'est pourquoi le reste des thermocouples est placé dans quelques flacons, et ce, de manière hermétique (utilisation de ruban adhésif spécial autoclave). Les flacons représentent les produits les plus critiques pour chaque cycle : produit A pour le cycle 1, le produit B pour le cycle 2 et le produit I pour le cycle 3.

- Critère d'acceptation : F_0 minimum de 15

Trois essais consécutifs sont effectués avec une charge maximale afin que l'étude soit représentative de la répétabilité. Certaines revues basées sur l'expérience préconisent de faire également le test sur une charge minimale. Lors de la QO, un cycle à vide avec indicateurs biologiques a été réalisé, démontrant la destruction de 10^6 germes de *Geobacillus stearothermophilus*. Le test de qualification de performance est donc réalisé 3 fois en charge, correspondant à la configuration worst-case.

Vérification de la stérilisation à l'aide d'indicateurs biologiques

Parallèlement à la vérification de la valeur stérilisatrice F_0, des bioindicateurs (ampoules contaminées à 10^6 germes de *Geobacillus thermophilus*) sont placés selon un schéma défini au sein de la charge et à l'intérieur de quelques flacons. Deux témoins sont également utilisés : un témoin négatif dans la charge et un témoin positif ne subissant pas le cycle de stérilisation.

- Critère d'acceptation :
  - A l'issue du cycle de stérilisation, aucune pousse bactérienne ne doit être observée après les 48h d'incubation à 55°C pour chaque indicateur et pour le témoin négatif
  - Trouble du milieu nutritif pour le témoin positif

Ce test démontre la capacité du cycle de stérilisation à fournir un NAS minimum de 10^{-6} et constitue une preuve supplémentaire de la bonne efficacité du procédé.

Evaluation de la siccité de la charge

Ce test permet de démontrer que le cycle de fonctionnement n'entraine pas un taux d'humidité excessif de la charge. On vérifie par contrôle visuel que les flacons sont bien secs en sortie d'autoclave.

- Critère d'acceptation : charge sèche après le cycle de stérilisation, à l'ouverture de la porte de l'autoclave : aucune trace d'humidité sur les flacons

4.5.6. Conclusion

Les essais utilisés pour cette qualification initiale apportent la preuve de la bonne performance de l'équipement. C'est pourquoi, après la fin de cette qualification et la conformité de chaque essai, l'équipement sera apte à fonctionner efficacement et à fournir des résultats reproductibles. Il pourra être utilisé en routine pour stériliser tous les produits inclus dans le protocole.

Si un nouveau produit est amené à être stérilisé sur cet autoclave, une étude devra être menée afin de déterminer s'il n'est pas un produit worst-case et qu'une requalification n'est pas nécessaire.

4.6 Surveillance de la validation

Il est important de faire des contrôles réguliers sur les procédés de stérilisation ; Cela contribue à l'assurance de qualité du résultat attendu : équipement fiable et produits correctement stérilisés. L'objectif de ce travail est d'instaurer une méthode entrant dans la démarche qualité et répondant aux normes, dans le but de fournir un cadre à la validation de routine des autoclaves.

4.6.1. Recherches

Les questions auxquelles nous devons répondre, dans l'objectif d'effectuer une synthèse, sont :

- Qu'est-ce qui est fait actuellement ?
- Qu'est-ce qui doit être fait ?

De nombreux textes relatifs à la validation des autoclaves existent dans la littérature, mais il est difficile de savoir exactement comment réaliser l'essai et à quelle fréquence, les normes restant très floues à ce sujet. Afin de synthétiser et d'encadrer au mieux cette validation, nous avons analysé les BPF, les normes relatives à la stérilisation par chaleur humide ainsi que des revues relayant des informations basées sur l'expérience acquise quant à la validation de ce procédé.

Cette recherche a permis de mettre en évidence que des améliorations et des mises à jour étaient envisageables en termes de procédures, tests et procédés chez Ceva.

Le tableau 11 décrit, selon chaque norme/revue, les essais nécessaires à la validation de routine.

Tableau 11. Recommandations pour la validation de routine des autoclaves selon la littérature

Normes ISO 17665-1 et ISO 17665-2 Stérilisation des produits de santé - Chaleur humide - (68)	**Revue La Vague Rationalisation des qualifications périodiques des autoclaves pour les formes injectables** (71)	**Swiss Medic Guide pour la validation et le contrôle de routine des procédés de stérilisation à la vapeur d'eau dans les établissements de soins** (72)	**Revue STP Pharma Stérilisation à la chaleur humide : guide de qualification d'un équipement** (73)
Essai de débit de fuite d'air (*1 fois/an min*)	Test de tenue au vide	Essai de fuite d'air	Test d'étanchéité
Essai de pénétration de vapeur (*1 fois/jour min*)	Pénétrabilité vapeur (Bowie Dick)	Pénétration vapeur par Bowie Dick quotidien	-
Commande automatique (vérifier que le cycle opérationnel continue de fonctionner correctement) (*1 fois/an min*) Maintenance effectuée	-	Entretien et contrôle de fonctionnement corrects	Gestion du pilotage, sécurités, alarmes
Procédé de stérilisation (*1 fois/an min*)	Validation périodique des charges par challenge microbiologique *(1 fois/an)*	-	Revalider les charges
Qualité de vapeur (*1 fois/an min*)	-	Surveillance et qualité de la vapeur saturée *(tous les 5 ans min)*	-
Profil de température et pression (*1 fois/an min*)	-	-	Distribution thermique
Siccité et intégrité de l'emballage	-	Siccité et intégrité de l'emballage	-

La norme NF ISO 17665 donne de nombreuses indications, seulement le déroulement de l'essai reste obscur. Afin de mieux comprendre ceci, nous nous sommes appuyés sur la norme NF EN 285 qui définit les procédures d'essai et les critères d'acceptation.

A l'issue de ces recherches, une réunion a eu lieu avec les différents responsables de services concernés, notamment le responsable maintenance, le responsable fabrication etc. ; tous impliqués dans ces futurs changements. Nous avons estimé les ajouts devant être instaurés, ré-évaluer les fréquences, mesuré l'impact de ces modifications en matière de procédures et cherché à optimiser cette validation afin d'économiser les ressources nécessaires.

4.6.2. Tests à effectuer en routine

Pour résumer ces recherches, la validation de routine des quatre autoclaves de production comprendra :

- **Une requalification annuelle**, effectuée par le responsable métrologie, avec :
    - **Un test d'étanchéité** (ou essai de débit de fuite d'air),
    - **Un test Helix** pour charge creuse (test de pénétration de la vapeur dans les charge creuse comme les tuyaux etc…)[7],
    - **Etalonnage et vérification des chaines de mesure**,
    - **Cartographie de l'autoclave en température à vide, 3 fois**

Afin de gagner du temps, nous utiliserons ici aussi le principe de worst-case. Ce contrôle porte sur l'homogénéité de la température dans l'autoclave pendant toute la durée de la stérilisation, donc le cycle le plus critique est le cycle le plus long (par exemple le cycle n°3 de trente minutes pour l'autoclave pour stérilisation terminale).

- **Vérification de la valeur stérilisatrice F_0, en charge, 3 fois.**

Ce test est effectué sur le cycle le plus critique en termes de stérilité par autoclave, déterminé

[7] Non applicable pour l'autoclave des PSF car aucune charge creuse (flacons scellés)

selon les valeurs stérilisatrices F_0 minimales obtenues lors de la dernière qualification annuelle. Les autres cycles sont testés une seule fois, en alternance, chaque année.

- **Corrélation pression/température** pour vérifier que la vapeur est bien saturée dans l'autoclave (grâce à la table de Regnault).

Cette requalification assure la bonne performance de chaque autoclave. En effet, elle permet de garantir la bonne étanchéité, la bonne pénétration de la vapeur, l'efficacité de la stérilisation, le bon fonctionnement avec des températures adéquates pour toute la durée du cycle ainsi que le contrôle de la vapeur saturée.

L'*Annexe 3* représente un extrait de la procédure de requalification annuelle.

- **<u>Une QP</u> tous les cinq ans**

Lors de cette QP, on réalise la validation des charges par challenge microbiologique, apportant, encore une fois, la certitude d'un procédé maîtrisé. Cette fréquence est choisie selon l'expérience du site Ceva, qui l'emploie depuis des années.

- **<u>Une vérification de la qualité de la vapeur saturée</u> tous les ans**

La présence de gaz non condensables, de surchauffe, et le taux d'humidité sont contrôlés selon la norme NF ISO 17665. C'est le responsable infrastructures qui s'occupe de ce test en employant un organisme extérieur habilité.

- **<u>Un contrôle visuel des charges</u>** à la sortie de l'autoclave, pour chaque lot de produits stérilisés

Les opérateurs de production vont vérifier, comme le demande la norme, si les charges sont sèches et sans dommages, et rapporter le résultat dans le dossier de lot du médicament fabriqué.

- **<u>Un test de Bowie Dick</u> tous les 2 mois**

Comme écrit dans le tableau 11, la norme NF ISO 17665-2 préconise de faire un test de Bowie Dick quotidien, mais c'est une information, et non une obligation (la partie 2 de la norme ISO

17665 concerne les directives générales). Chez Ceva, ce test est effectué depuis des années tous les deux mois par les techniciens de fabrication.
Pour rappel, cet essai vise à évaluer la pénétration de la vapeur dans des corps poreux, donc peu adapté dans une industrie pharmaceutique, mais c'est à l'heure actuelle encore la référence en la matière.
Après discussions, évaluation de la rentabilité (c'est un test qui coûte cher en utilisation journalière) et approbation d'un inspecteur de l'ANSES, il a été décidé de garder cette fréquence. Bien entendu, c'est à chaque entreprise d'en décider.

- **<u>Une maintenance préventive</u> tous les trimestres**

Sous la responsabilité du responsable maintenance, le fournisseur des autoclaves (Sofast) effectuera la maintenance de ceux-ci avec notamment des essais de fonctionnement et un test d'étanchéité. La norme NF ISO 17665 recommande de tester le bon fonctionnement du cycle une fois par an. C'est pour cette raison que nous décidons de l'ajouter au calendrier de la maintenance préventive. Aucune fréquence n'étant définie quant à la maintenance globale, après concertation et selon son expérience, le fabriquant a proposé de venir tous les trimestres.

- **<u>Un contrôle permanent de chaque cycle de stérilisation</u>**

L'opérateur de production en charge de l'autoclavage vérifie les paramètres température, pression et temps et la bonne impression du cycle de stérilisation effectué.

Le **test de Bowie Dick** est bien connu de tous les fabricants et est utilisé depuis de nombreuses années. Il est décrit de façon précise dans les différentes normes et revues traitant de la stérilisation à la vapeur. En revanche, son analogue, le **test Helix**, est bien moins connu et est pourtant utile pour certains types de matériel contenant des cavités.
Le test Helix est un tube enroulé ouvert à une extrémité et relié à l'autre extrémité à une capsule hermétique dans laquelle on place un indicateur de stérilisation. Le cycle ainsi que le critère d'acceptation sont semblables à celui du test de Bowie Dick.

Figure 23. Tube et indicateurs pour le test Helix (74)

Le test de Bowie Dick concerne davantage les charges poreuses (linges…), alors que le test Helix concerne les charges creuses (tuyaux…). Le test de Bowie Dick étant effectué tous les deux mois, le test Helix sera réalisé lors de la qualification annuelle pour évaluer la bonne pénétration de la vapeur.

4.6.3. Conclusion

Suite à cette étude, les ajouts, l'optimisation et la détermination de la fréquence des essais chez Ceva, sont résumés dans le tableau 12 ci-dessous.

Tableau 12. Récapitulatif de la validation de routine avant et après optimisation chez Ceva

Surveillance de la validation chez Ceva avant optimisation		**Optimisation de la validation de routine**
Requalification annuelle	Test d'étanchéité	À poursuivre
	Etalonnage chaînes de mesure	À poursuivre
	Cartographie en température du cycle le plus critique	À poursuivre
	Vérification du F_0 de chaque cycle	Seulement le cycle le plus critique chaque année, les autres cycles en alternance
	Absence de test	Test de pénétration de vapeur : test Helix

	Absence de test	Vérification de la corrélation pression/température
QP tous les 5 ans avec validation des charges par challenge microbiologique		À poursuivre
Qualité de la vapeur : imprécis		Tous les ans avec contrôle des gaz non condensables, surchauffe et taux d'humidité
Absence de test		Contrôle visuel des charges : intégrité et siccité des produits autoclavés
Bowie Dick tous les 2 mois		À poursuivre
Maintenance : imprécis		Maintenance préventive tous les trimestres avec essais de fonctionnement et test d'étanchéité
Contrôle du cycle de stérilisation		À poursuivre

4.7 Conclusion sur l'optimisation de la validation du procédé de stérilisation par autoclavage

Des définitions générales concernant la qualification d'un équipement existent, notamment dans les BPF, mais chaque équipement est différent, et plus particulièrement en matière de criticité. C'est pourquoi chaque système a une qualification qui lui est propre même si la logique et le fond restent les mêmes. La stérilisation à la chaleur humide, bien qu'étant un procédé fiable, n'en reste pas moins critique du point de vue du grand nombre de paramètres la qualifiant, mais aussi aux vues des conséquences possiblement engendrées si ce procédé n'était pas convenablement vérifié.

Avec l'expérience, la qualification « classique » peut être améliorée, en assurant la bonne maîtrise du procédé par des tests supplémentaires. Elle peut également être optimisée et simplifiée grâce au principe du worst case dont la détermination permet une économie de ressources matérielles, humaines et énergétiques, non négligeables pour une industrie pharmaceutique.

La validation de routine de ce procédé de stérilisation contribue à l'assurance qualité continue des produits fabriqués. La principale norme régissant la validation des grands stérilisateurs, la norme NF 17665, apporte de nombreux renseignements pour la validation de routine, mais elle reste finalement assez floue sur l'obligation des essais à fournir, et de leur fréquence. Mon travail a donc été de mettre en place un protocole incluant des tests réguliers à réaliser, encadrant chaque paramètre de l'autoclave, et notamment en travaillant avec des worst-case, toujours dans un souci de rentabilité.

Toutes ces recherches prennent du temps, et demandent des moyens. Mais elles nous permettent d'obtenir un procédé entièrement validé dans les limites fixées, et une validation qui sera durable et rentable.

5. Conclusion générale

Ce travail permet d'étoffer et de sécuriser une qualification d'autoclave en encadrant chaque point critique susceptible d'influer sur la qualité du produit fabriqué et d'adopter des choix stratégiques afin de faciliter l'organisation et réduire le temps d'une qualification. Il est important, et encore plus pour les équipements complexes tels que les autoclaves, de se pencher scrupuleusement sur la démarche de validation et de l'optimiser au mieux.

Un procédé entièrement maîtrisé permet de réduire les futures non-conformités et les requalifications qui s'en suivent. La préservation de la qualité constante des produits évite de coûteuses actions de rappel et améliore la satisfaction de la clientèle.

Le procédé de stérilisation à la chaleur humide est bien connu mais la validation est un processus qui n'est pas figé dans le temps car chaque système est passible d'évolution. La législation en matière d'assurance qualité, ne cesse de se renforcer et il est indispensable de prendre les devants sur une réglementation qui reste souvent trop vague.

Pour toutes ces raisons et au regard du scepticisme dont est victime l'industrie pharmaceutique, il est indispensable d'entrer dans une démarche d'amélioration continue. Ce qui implique d'être encore plus rigoureux et d'adopter un programme de validation robuste afin d'obtenir une chaîne de production irréprochable. Ceci dans le but de reforger une relation de confiance qui se délite aujourd'hui entre les professionnels du médicament et les patients. Une défaillance de ce système pourrait entrainer une non stérilité d'un médicament et un grand risque pour le futur utilisateur. Il est de notre devoir de se former continuellement pour évoluer en temps réel avec la législation mais surtout d'aller au-delà des normes en cherchant à tendre vers le risque zéro.

La stérilisation à la chaleur humide constitue un procédé économique, fiable et reproductible, et représente donc un choix de première intention dans sa catégorie. Pourtant, celle-ci sera peut-être un jour remplacée, notamment par des méthodes athermiques (les rayons X par exemple). Déjà, de nouvelles approches apparaissent. C'est pourquoi, toutes ces méthodes ayant une validation particulière, il sera nécessaire pour chacune d'entre elles d'adopter une démarche qualité implacable en renforçant cette étape primordiale de validation.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. Pharmacopée Européenne. 9.4. Direction Européenne de la Qualité du Médicament; 2017; p 4581-4588.

2. SAURABH SINGH. Physical methods of sterilisation [En ligne]. 2015 juill 31 [cité 8 janv 2018]. Disponible sur: https://fr.slideshare.net/SaurabhSingh156/physical-methods-of-sterilisation-51150094

3. LEVACHER E. PHI 41 Pharmacotechnie industrielle. 2e éd. Institut des Métiers et des Technologies; 2006. 673 p.

4. KASLIN E, JOST M, RUEGGER M, KUNZ I. Manipulation en toute sécurité de l'oxyde d'éthylène et du formaldéhyde [En ligne]. Suva; 2007 [cité 12 févr 2018]. Disponible sur: http://www.sohf.ch/Themes/Sterilisation/SBA_501_F.pdf

5. Stérilisation à l'Oxyde d'Ethylène [En ligne]. Bio Steril. [cité 12 févr 2018]. Disponible sur: http://www.bio-steril.fr/sterilisation-loxyde-dethylene

6. RUTALA W, WEBER D, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities [En ligne]. Centers for Disease Control and Prevention; 2008 [cité 28 févr 2018]. Disponible sur: https://stacks.cdc.gov/view/cdc/11560

7. EtO Sterilizer Validation [En ligne]. Ellab Thermal Validation. [cité 8 janv 2018]. Disponible sur: http://www.ellab.fr/applications/medical/sterilisation-eto

8. BEN SAKHRIA A. Stérilisation des préparations injectables [En ligne]. Analytical Toxicology. 2016 [cité 8 janv 2018]. Disponible sur: https://www.analyticaltoxicology.com/sterilisation-preparations-injectables/

9. NOTTEBAERT S. La stérilisation [En ligne]. Entre'EIDE. 2013. Disponible sur: http://entreide.free.fr/cours/1a/ue210s1/C3%20UE%202.10%20LA%20STERILISATION%20version%20%20Novembre.pdf

10. GOULLET D, DEWEERDT C, VALENCE B, CALOP J. Fiches de stérilisation. 2003; Disponible sur: http://www.sf2s-sterilisation.fr/wp-content/uploads/2016/08/fichesterilisation-hygiene_2003-1-2.pdf

11. GALTIER F. La stérilisation. Paris: Arnette; 1996. 216 p. (Pharmascopie-soins et thérapies).

12. ANSES. Evaluation des risques sanitaires liés à la présence de formaldéhyde [En ligne]. ANSES - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. 2016 [cité 14 févr 2018]. Disponible sur: https://www.anses.fr/fr/content/evaluation-des-risques-sanitaires-li%C3%A9s-%C3%A0-la-pr%C3%A9sence-de-formald%C3%A9hyde

13. BRETTE Y. Les procédés de stérilisation [En ligne]. Stérilisation Hopital. 2008 [cité 8 janv 2018]. Disponible sur: http://www.sterilisation-hopital.com/post/2008/10/25/Les-procedes-de-sterilisation

14. TIPNIS NP, BURGESS DJ. Sterilization of implantable polymer-based medical devices : A review. *International Journal of Pharmaceutics* [En ligne]. 20 déc 2017 [cité 27 févr 2018]; Disponible sur: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517317311304

15. Hydrogen Peroxide Gas Plasma [En ligne]. Centers for Disease Control and Prevention. 2016 [cité 28 févr 2018]. Disponible sur: https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/sterilization/hydrogen-peroxide-gas.html

16. STERRAD® Sterilization [En ligne]. Verdict Hospital. [cité 21 févr 2018]. Disponible sur: http://www.hospitalmanagement.net/contractors/sterilization/sterrad-sterilization/attachment/sterrad-sterilization1/

17. H2O2 Sterilization [En ligne]. Ellab Thermal Validation. [cité 8 janv 2018]. Disponible sur: http://www.ellab.fr/applications/medical/sterilisation-h2o2

18. GUIMIER-PINGAULT C. Stérilisation basse température au Peroxyde d'Hydrogène [En ligne]. CHU de Grenoble; 2016. Disponible sur: http://www.sf2s-sterilisation.fr/wp-content/uploads/2016/08/20162%20CGuimier_%20SBT%20Que%20choisir.pdf

19. VERJAT-TRANNOY D, VADROT C, DANAN C, RACHON A. Analyses en microbiologie - Produits stériles. *Techniques de l'Ingénieur* [En ligne]. 10 déc 2006. Disponible sur: https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/biomedical-pharma-th15/qualite-et-controle-des-medicaments-42642210/analyses-en-microbiologie-p3354/

20. RATHORE N, SHAH M, KOHLE P. Sterile Product Development : Formulation, Process, Quality and Regulatory Considerations. New York: Springer New York; 2013. 602 p. (AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series).

21. Review of radiation sterilization technologies for medical devices [En ligne]. IBA; [cité 2 mars 2018]. Disponible sur: http://www.iba-industrial.com/downloads/sterilization-of-medical-devices/17

22. Faisceau d'électrons [En ligne]. Sterigenics. [cité 8 févr 2018]. Disponible sur: http://www.sterigenics.com/french/Sterilization_Technologies/Electron_Beam.php

23. Gamma Irradiation Processing [En ligne]. STERIS AST - Contract Sterilization & Decontamination Services. [cité 8 janv 2018]. Disponible sur: https://www.steris-ast.com/services/gamma-irradiation/

24. Gamma Industry Processing Alliance (GIPA), International Irradiation Association (iia). A comparison of Gamma, E-beam, X-ray and Ethylene Oxide technologies for the industrial sterilization of medical devices and healthcare products [En ligne]. 2017. Disponible sur: http://gipalliance.net/wp-content/uploads/2013/01/GIPA-WP-GIPA-iia-Sterilization-Modalities-FINAL-Version-2017-October-308772.pdf

25. CHALLAND A. Stérilisation et emballage médical. In 2016. Disponible sur: http://medicalpackaging-conference.com/IMG/uploads/files/ALAIN%20CHALLAND%20-%20STERIS%20-%20La%20contrainte%20de%20la%20ste%CC%81rilisation%20dans%20le%20choix....pdf

26. BEREJKA A. Ray of hope – sterilisation using X-rays [En ligne]. Medical Device Developments. 2014 [cité 2 mars 2018]. Disponible sur: http://www.medicaldevice-developments.com/features/featureray-of-hope-sterilisation-using-x-rays-4212494/

27. LIMAYEM BLOUZA I. Cours Filtration Galenique [En ligne]. Scribd. 2014 [cité 14 févr 2018]. Disponible sur: https://www.scribd.com/document/333720141/Cours-Filtration-Galenique

28. Organisation internationale de normalisation. ISO 13408-1 - Traitement aseptique des produits de santé — Partie 1: Exigences générales. 2008.

29. Dry Heat Sterilizer [En ligne]. Bionics Scientific Technologies. [cité 15 févr 2018]. Disponible sur: http://www.bionicsscientific.com/autoclave-sterilizer/dry-heat-sterilizer-depyrogenation-oven.html

30. Conseil Supérieur d'Hygiène. Recommandations en matière de stérilisation, 2006, n° 7848/1. Conseil Supérieur d'Hygiène; 2006.

31. Méthodes de stérilisation physiques et chimiques [En ligne]. Certoclav. 2015 [cité 2 mars 2018]. Disponible sur: http://certoclav.com/de/support/knowledge/show/methodes-de-sterilisation-physiques-et-chimiques-1.htm

32. CUBERTAFOND A, MOUNIER M, DENIS F. Bactériologie médicale - Chapitre 6 - Stérilisation [En ligne]. 2e éd. ELSEVIER MASSON; 2011. 640 p. Disponible sur: http://www.sciencedirect.com.docelec.u-bordeaux.fr/science/article/pii/B9782294096686000068

33. La lumière pulsée - Principes et action sur les microorganismes [En ligne]. Claranor Pulsed Light Sterilization. [cité 8 févr 2018]. Disponible sur: http://www.claranor.fr/la-lumiere-pulsee

34. Les nouvelles technologies de destruction des micro-organismes [En ligne]. Biotech Rouen; 2010. Disponible sur: http://biotech.spip.ac-rouen.fr/IMG/pdf/nellestechdestrmicro.pdf

35. GATT G. La Lumière pulsée. juin 2009 [cité 8 janv 2018]. *La Vague*. Juin 2009; (28). Disponible sur: https://www.a3p.org/index.php/articles-techniques-et-scientifiques/1326-la-lumi%C3%A8re-puls%C3%A9e-la-vague-28.html)

36. PERRIER-CORNET J-M, MOUSSA M, GERVAIS P. Applications des hautes pressions hydrostatiques en agroalimentaire. *Techniques de l'Ingénieur* [En ligne]. 10 mars 2009 [cité 8 janv 2018]. Disponible sur: https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/operations-unitaires-du-genie-industriel-alimentaire-42430210/applications-des-hautes-pressions-hydrostatiques-en-agroalimentaire-f3225/action-de-la-pression-sur-la-matiere-f3225niv10003.html

37. Qu´est-ce que les hautes pressions? [En ligne]. Hyperbaric. [cité 15 févr 2018]. Disponible sur: http://www.hiperbaric.com/fr/hautes-pressions

38. GUEROULT P, LEMAGNEN G. Les injectables. Faculté de Pharmacie de Bordeaux; 2016.

39. L'application des Hautes Pressions ou Pascalisation [En ligne]. Génie Alimentaire. 2012 [cité 5 mars 2018]. Disponible sur: http://genie-alimentaire.com/spip.php?article112

40. PETIT B, RITZ M, FEDERIGHI M. Nouveaux traitements physiques de conservation des aliments : revue bibliographique - 1ère partie : les champs électriques et magnétiques pulsés. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 2002;(153). p 547-556.

41. REINEKE K, SCHOTTROFF F, MENESES N, KNORR D. Sterilization of liquid foods by pulsed electric fields–an innovative ultra-high temperature process. *Frontiers in Microbiology* [En ligne]. 6 mai 2015 [cité 5 mars 2018];6. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4422003/

42. Pulsed electric fields and spore inactivation [En ligne]. Hightech Europe; 2012 [cité 5 mars 2018]. Disponible sur: http://www.foodtech-portal.eu/index.php?title=Special:PdfPrint&page=Pulsed+electric+fields+and+spore+inactivation

43. Advantages of Microwave Sterilization on Condiments [En ligne]. FOODRECAP. 2013 [cité 15 févr 2018]. Disponible sur: http://foodrecap.net/manufacture/guide/microwave-sterile/

44. BARBOSA-CANOVAS GV, MEDINA-MEZA I, CANDOGAN K, BERMUDEZ-AGUIRRE D. Advanced retorting, microwave assisted thermal sterilization (MATS), and pressure assisted thermal sterilization (PATS) to process meat products. *Meat Science*. 1 nov 2014;98(3). p420-434.

45. X-ray Irradiation Processing [En ligne]. STERIS AST - Contract Sterilization & Decontamination Services. [cité 8 janv 2018]. Disponible sur: https://www.steris-ast.com/services/x-ray-irradiation/

46. MAGNIEZ. La stérilisation par destruction [En ligne]. Biotechnologie - The biotechnological site for the future. 2010 [cité 8 janv 2018]. Disponible sur: http://www.technobio.fr/pages/La_sterilisation_par_destruction-2646356.html

47. L'Usine Nouvelle. Hygiene : Des flashs de lumière pour la stérilisation. *L'usine nouvelle* [En ligne]. 29 avr 1999 [cité 5 mars 2018];(2685). Disponible sur: https://www.usinenouvelle.com/article/hygiene-des-flashs-de-lumiere-pour-la-sterilisation.N92407

48. LEVY C. Principaux facteurs influençant l'efficacité de la lumière pulsée pour la décontamination des microorganismes pathogènes et d'altération des denrées alimentaires [En ligne]. Université Montpellier II; 2010 [cité 5 mars 2018]. Disponible sur: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00747302/document

49. CELANDRONI F, LONGO I, TOSORATTI N, GIANNESSI F, GHELARDI E, SALVETTI S, et al. Effect of microwave radiation on Bacillus subtilis spores. *Journal of Applied Microbiology*. 1 déc 2004 [cité 6 mars 2018];97(6). p 1220-1227.

50. Summary of advantages and disadvantages of commonly used sterilization technologies [En ligne]. Centers for Disease Control and Prevention. 2016 [cité 28 févr 2018]. Disponible sur: https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/tables/table6.html

51. Norme EN ISO 9000 : Systèmes de management de la qualité - Principes essentiels et vocabulaire. Organisation internationale de normalisation; 2015.

52. Quality Systems Approach to Pharmaceutical cGMP Regulations [En ligne]. FDA; 2006. Disponible sur:

https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070337.pdf

53. Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing - Current Good Manufacturing Practice [En ligne]. FDA; 2004. Disponible sur: https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070342.pdf

54. Process Validation : General Principles and Practices [En ligne]. FDA; 2011. Disponible sur: https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070336.pdf

55. Bonnes Pratiques de Fabrication. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé; 2017.

56. Validation des processus de production et de préparation du service [En ligne]. ZLG; 2007. Disponible sur: https://www.tuv.com/media/france/essentiel/normes/309_0707_B18_Validation_des_processus_incluant_le_logiciel_FR.pdf

57. CERTOCLAV. Autoclave - définition [En ligne]. Autoclave CertoClav. 2013 [cité 9 janv 2018]. Disponible sur: http://autoclave-certoclav.blogspot.com/2013/03/autoclave-definition.html

58. Steam Sterilization [En ligne]. Centers for Disease Control and Prevention. 2008 [cité 9 janv 2018]. Disponible sur: https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/sterilization/steam.html

59. ACHARYA T. Moist heat sterilization: Definition, Principle, Advantages and Disadvantages [En ligne]. Microbeonline. 2013 [cité 9 janv 2018]. Disponible sur: https://microbeonline.com/moist-heat-sterilization-definition-principle-advantages-disadvantages/

60. Stérilisateur de moyenne et grande capacité [En ligne]. COLUSSI. [cité 22 févr 2018]. Disponible sur: https://www.colussi.fr/hopitaux-cliniques/sterilisation/sterilisateur-de-moyenne-et-grande-capacite/sterilisateur-de-moyenne-et-grande-capacite-series-sa040-sa060-sa080-sa100-sa120/

61. FANACK M. Stérilisation - Etude et mise en fonction d'autoclaves [En ligne]. Stérilisation Hopital. 2009. Disponible sur: http://www.sterilisation-hopital.com/public/documentation/Rapport_autoclave_luxembourg.pdf

62. BRETTE Y. Les lois de la stérilisation [En ligne]. Stérilisation Hopital. 2008 [cité 9 janv 2018]. Disponible sur: http://www.sterilisation-hopital.com/post/2008/10/20/Les-lois-de-la-sterilisation

63. WEILL D. Méthodes de stérilisation [En ligne]. Sterigene. 2011. Disponible sur: https://www.sterigene.com/p31-methodes-de-sterilisation.php#5

64. Autoclave Steam Sterilization Cycles, Part 6 : F0 Cycle [En ligne]. Consolidated Sterilizer Systems. 2014 [cité 9 janv 2018]. Disponible sur: https://consteril.com/steam-autoclave-sterilization-cycles-part-6-f-sub-zero/

65. Norme NF EN ISO 17665-2 : Stérilisation des produits de santé - Chaleur humide - Partie 2 : Directives relatives à l'application de l'ISO 17665-1. AFNOR; 2009.

66. AMCOR. Documentation - Emulateurs [En ligne]. SPS Laboratoires. [cité 8 févr 2018]. Disponible sur: http://www.sps-amcor.fr/f-52-documentation-emulateurs-ns-fr.pdf

67. Indicateur biologique de stérilisation [En ligne]. MesaLabs. [cité 8 févr 2018]. Disponible sur: http://www.medicalexpo.fr/prod/mesa-laboratories-inc/product-69380-749170.html

68. Norme NF EN ISO 17665-1 : Stérilisation des produits de santé - Chaleur humide - Partie 1 : Exigences pour le développement, la validation et le contrôle de routine d'un procédé de stérilisation des dispositifs médicaux. AFNOR; 2006.

69. Norme NF EN 285 : Stérilisation - Stérilisateurs à la vapeur d'eau - Grands stérilisateurs. AFNOR; 2016.

70. Indicateurs Stérilisation [En ligne]. Dutscher - Consommables et matériels de laboratoire. [cité 17 janv 2018]. Disponible sur: https://www.dutscher.com/data/pdf/fr/fr/page1147.pdf

71. NARBONNE V, GARCIA J-M. Rationalisation des qualifications périodiques des autoclaves, des tunnels de dépyrogénation et des laveuses de flacons pour les formes injectables. *La Vague*. Janvier 2016;(48).

72. CAVIN F, HERMANN N, GIEZENDANNER P, REGARD P, STIEGLER H, MARTI P, et al. Guide pour la validation et le contrôle de routine des procédés de stérilisation à la vapeur d'eau dans les établissements de soins [En ligne]. Swissmedic; 2010 [cité 16 mars 2018]. Disponible sur: http://ge.ch/sante/media/site_sante/files/imce/groupe-risque-esi/doc/validation_controle_routine_sterilisation-f.pdf

73. Stérilisation à la chaleur humide : guide de qualification d'un équipement. *STP Pharma Pratiques*. févr 2004;14.

74. Test Helix pour autoclave [En ligne]. PMD-MEDICAL.COM. [cité 21 févr 2018]. Disponible sur: https://www.pmd-medical.com/test-helix-pour-autoclave-xml-3559_3560_3614-26094.html

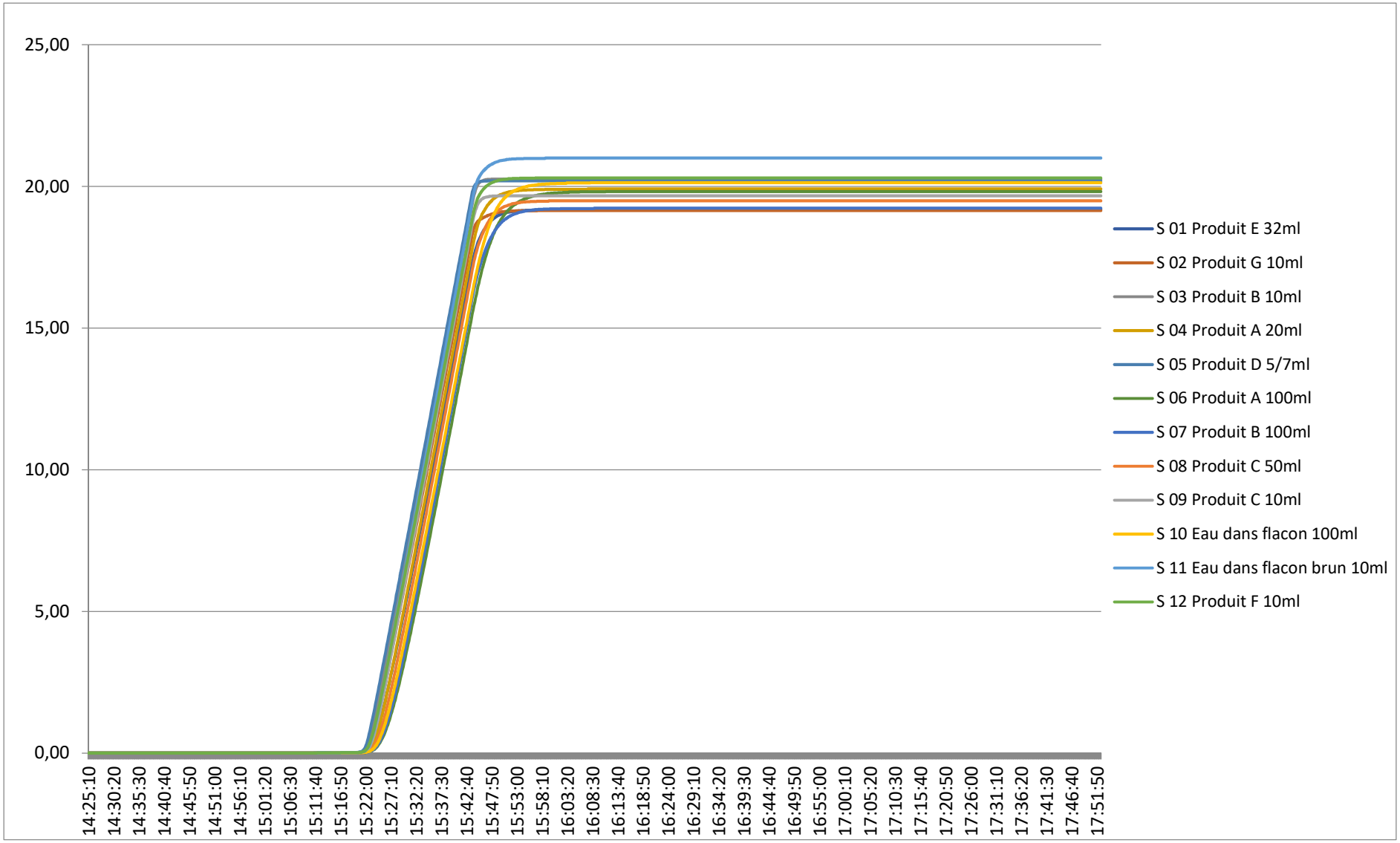
ANNEXES

ANNEXE 1 : PARAMÈTRES DE STÉRILISATION DE CHAQUE AUTOCLAVE CEVA

		Autoclave TX 1210 - Lyophilisation			Autoclave TX1480 - Laverie				Autoclave TX700 - Solutions	
Paramètres de stérilisation	Cycle	MATERIEL	FILTRES	LIQUIDE (Bidons d'eau)	MATERIEL	LIQUIDE (Bidon-Ballon)	FILTRES	BOUCHONS	MATERIEL	LIQUIDES FILTRES
	Vide/chauffe	Phase de prétraitement								
	Stérilisation	T = 121.0°C Durée : 45 min	T = 121.0°C Durée : 30 min	T = 121.0°C Durée : 50 min	T = 121°C 45 min	T = 121.0°C 50 min	121.0°C 60 min	121.0°C 10 min	T = 121.0°C Durée : 45 min	T = 121.0°C Durée : 45 min
	Séchage / refroidissement	P = 200 mb Durée : 120 min	P = 2300 mb T = 80.0°C	P = 2300 mb T = 80.0°C	P = 130 mb Durée : 45 min	P = 2300 mb T = 80.0°C	P = 2300 mb T = 80.0°C	P = 130 mb Durée : 45 min	P = 100 mb Durée : 10 min	P = 2200 mb T = 50.0°C

		Autoclave pour stérilisation terminale - PSF		
Paramètres de stérilisation	Cycle	N°1	N°2	N°3
	Vide/chauffe	150 mbar de vide		
	Stérilisation	T = 121.0°C Durée : 15 min	T = 121.0°C Durée : 15 min	T = 121.0°C Durée : 30 min
	Séchage / refroidissement	Refroidissement 50°C	Refroidissement 70°C	Refroidissement 70°C

ANNEXE 2 : ÉVOLUTION DE LA VALEUR STERILISATRICE F_0 EN FONCTION DU TEMPS LORS DE L'ÉTUDE DU WORST CASE PRODUIT



Note : S01, S02… représentent les sondes (thermocouples) mesurant la température, placées à l'intérieur de chaque flacon de produit, de façon hermétique.

ANNEXE 3 : EXTRAIT DE LA PROCÉDURE DE QUALIFICATION ANNUELLE

1. Etalonnage des sondes de température

Les sondes de température de l'autoclave sont placées dans le four de calibration et la correspondance avec l'affichage sur l'enregistreur/régulateur est vérifiée. La vérification métrologique est faite de manière à encadrer la plage de fonctionnement.

Ce contrôle est documenté dans le rapport de validation.

Critère d'acceptation :
± 2°C

2. Etalonnage de la sonde de pression

L'étalonnage se fait en comparant la valeur indiquée sur l'autoclave et un calibreur de pression. La vérification métrologique est faite de manière à encadrer la plage de fonctionnement.

Ce contrôle est documenté dans le rapport de validation.

Critère d'acceptation :
EMT ≤ 5 kPa

3. Test d'étanchéité

Le test d'étanchéité (ou essai de fuite d'air) est utilisé pour démontrer que le débit de la fuite d'air dans la chambre du stérilisateur pendant les phases de vide n'excède pas un niveau empêchant la pénétration de la vapeur d'eau dans la charge à stériliser, et ne constituera pas un risque potentiel de recontamination de la charge stérilisée pendant le séchage.

- Lancer le cycle spécifique « Test d'étanchéité » de l'autoclave, à vide
- Vérifier la conformité avec le critère d'acceptation

Ce contrôle est documenté dans le rapport de validation.

Critère d'acceptation :
Le taux de montée en pression ne doit pas être supérieur à 0,13 kPa/min (1,3 mbar/min).

4. Test Hélix pour charge creuse

Cet essai porte sur la pénétration de la vapeur d'eau dans les dispositifs médicaux comportant des cavités.

- Insérer un indicateur dans le tube Helix
- Placer le tube Helix dans la chambre de l'autoclave
- Effectuer un cycle de fonctionnement type « Bowie Dick » (134°C ; 3,5 minutes)

- À la fin de l'essai, examiner l'indicateur afin d'évaluer sa conformité aux exigences spécifiées

Ce contrôle est documenté dans le rapport de validation.

Critère d'acceptation :
La bandelette d'indication change de couleur, passant du rose au noir, lorsqu'elle est exposée à des conditions appropriées de stérilisation à la vapeur.

SERMENT DE GALIEN

« Je jure, en présence des maitres 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, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine de respecter le secret professionnel ;

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. »

La fabrication des médicaments stériles requiert une attention particulière en termes de qualité en vue de la sécurité de l'utilisateur. En effet, il est important de réduire au minimum les risques de contamination microbienne, particulaire et pyrogène pouvant survenir tout au long de la fabrication. Pour cela, l'assurance qualité joue un rôle primordial en mettant au point et en validant rigoureusement des méthodes de fabrication strictes afin d'obtenir à la fin de la production des produits stériles de qualité irréprochable.

Ce travail regroupe trois chapitres : une première partie fait un état des lieux des méthodes de stérilisation classiques et des nouvelles méthodes incluant la stérilisation par des agents chimiques (oxyde d'éthylène, formaldéhyde et gaz plasma de peroxyde d'hydrogène), la stérilisation par voie thermique (stérilisation par la vapeur et stérilisation par la chaleur sèche), la stérilisation par irradiation (électrons accélérés, rayons gamma et rayons X) et enfin les dernières avancées telles que la lumière pulsée, les hautes pressions hydrostatiques, les champs électriques pulsés et les micro-ondes.
Une deuxième partie rappelle les principes généraux de validation et qualification.
Enfin, la dernière partie développe la qualification initiale d'un autoclave après optimisation des tests grâce au principe du produit « worst-case ». Les autoclaves étant des équipements critiques, cette étude fournit également une méthode cadrant la validation de routine de ce procédé de stérilisation.

Global approach of the validation of sterilization by autoclaving: optimization and strategic choices

The production of sterile drugs requires particular attention regarding quality to ensure user's safety. Indeed, it is essential to minimize the risks of microbial, particulate and pyrogenic contamination that may occur throughout the manufacturing process. For that purpose, quality assurance plays a key role in developing and rigorously validating strict manufacturing methods in order to obtain sterile products with outstanding quality at the end of production.

This work is divided into three chapters: the first part reviews conventional and new sterilization methods including sterilization by chemical agents (ethylene oxide, formaldehyde and hydrogen peroxide plasma gas), heat sterilization (steam sterilization and dry heat sterilization), irradiation sterilization (E-beams, gamma rays and X-rays) and finally the latest advances such as pulsed light, high hydrostatic pressures, pulsed electric fields and microwaves.
A second part recalls the general principles of validation and qualification.
Finally, the last part develops the initial qualification of an autoclave after tests optimization thanks to the worst-case product principle. As autoclaves are critical equipments, this study also provides a method for routine validation of this sterilization process.

DISCIPLINE : Sciences Pharmaceutiques

MOTS-CLES : Stérilisation – Autoclaves – Validation – Qualification – Assurance Qualité – Stérilisation vapeur – Industrie pharmaceutique – Nouvelles méthodes stérilisation

---

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. : UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex