

Maîtrise de la contamination dans un secteur de remplissage aseptique

Clémence Cappelle

▶ **To cite this version:**

Clémence Cappelle. Maîtrise de la contamination dans un secteur de remplissage aseptique. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01927759

HAL Id: dumas-01927759

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01927759

Submitted on 20 Nov 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.

UNIVERSITE DE CAEN NORMANDIE

ANNEE 2017

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PRESENTEE PAR

CLEMENCE CAPPELLE

SUJET : MAITRISE DE LA CONTAMINATION DANS UN SECTEUR DE REMPLISSAGE ASEPTIQUE

SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE : 01/12/2017

JURY :

M. FREDERIC FABIS	PRESIDENT DU JURY
MME . HAFIDA ELMIR	EXAMINATEUR
M. GUILLAUME PIEN	EXAMINATEUR
M. GUILLAUME SAINT-LORANT	DIRECTEUR DE THESE

Remerciements

A mon président de jury, M. Frédéric Fabis, professeur des universités à l'UFR des sciences pharmaceutiques de Caen. Merci de m'avoir fait l'honneur de présider cette thèse d'exercice.

A mon directeur de thèse, M. Guillaume Saint-Lorant, praticien hospitalier au CHU de Caen, d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse et de m'avoir assisté dans son élaboration.

Aux membres de mon jury, Hafida Elmir, responsable remplissage aseptique sur le site de Sanofi Maisons-Alfort et ma maître d'apprentissage. Et à Guillaume Pien, pharmacien responsable d'équipe de production au LFB, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Au responsable des opérations stériles du site de Sanofi Maisons-Alfort, Philippe Nourigat, de m'avoir permis de réaliser mon alternance au sein du service de remplissage aseptique.

Merci à mes collègues, Virginie et Astou pour la superbe ambiance dans le même bureau au quotidien et leur précieux conseils. Merci à notre groupe de stagiaires, alternants et autres contrats du site de Maisons-Alfort : Marie, Fatima, Alexandre, Pierre, Marine et tous les autres pour ces bons moments passés en région parisienne.

A mes parents, Magali et Pascal pour l'affection et les moyens qu'ils m'ont donné pour réussir. Merci à mon frère Florian et à toute ma famille pour vos encouragements et tous les moments partagés ensemble.
A Julien, merci d'être à mes côtés, pour ton soutien et ta patience de chaque instant.

A Clémence, mon amie, ma binôme de toujours. Merci pour tous ces moments géniaux passés ensemble en cours, en soirées, en vacances.
A ma team Burkina, Guillaume et Zélia. Merci pour ce voyage qui nous a fait grandir et pour votre amitié.
Aux personnes qui ont marqué mon passage à la fac de pharmacie de Caen et qui en ont fait des années inoubliables : Xavier, Lucie, Pauline, Mélanie, Christy, Marguerite et à ceux que je n'ai pas la place de nommer.

A notre promotion du master MIDPPQO 2016-2017 rencontrée lors de mon passage au LTPIB et à ma coloc bordelaise, qui ont marqué la dernière année de ma vie étudiante.

Enfin à mes amies de longue date, toujours présentes malgré les années : Yolaine, Camille, Marion, Anne-Claire.

A tous les autres merci.

Table des matières

Remerciements 1
Glossaire 4
Introduction 5
Partie I – Production aseptique des préparations injectables 7
1. Les préparations injectables 7
1.1. Généralités 7
1.2. Caractéristiques 8
1.3. Techniques de stérilisation des préparations injectables 12
2. Les Zones à Atmosphère Contrôlée 16
2.1. Différentes classes de propreté 16
2.2. Différentes enceintes 18
3. Le processus de fabrication des solutions injectables 21
3.1. Préparation du matériel 21
3.2. Préparation de la solution 22
3.3. Répartition aseptique en zone conventionnelle 23
3.4. Inspection visuelle et conditionnement 27
4. Contrôles de la qualité des injectables 28
4.1. Contrôles en cours de production 28
4.2. Contrôles analytiques 30
4.3. Contrôles biologiques 30
Partie II – Maîtrise de la contamination 31
1. La contamination 31
1.1. Définition 31
1.2. Types de contamination 31
1.3. Sources et vecteurs de contamination 40
2. Monitoring environnemental associé au travail en ZAC 45
2.1. Monitoring des paramètres non viables 45
2.2. Monitoring des paramètres viables 46
2.3. L'analyse des tendances 51
3. Moyens de maîtrise 53
3.1. Normes et textes de référence pour la maîtrise de la contamination 53
3.2. Principes généraux de la maîtrise de la contamination 55
3.3. Nettoyage et désinfection 64
3.4. Validation du procédé et de l'aseptie 67
4. Gestion des anomalies 72
4.1. Emission, gestion et suivi des déviations qualité 72

4.2. Mise en place de CAPA en réponse à ces anomalies 76
Partie III –Cas d'un Test de Remplissage Aseptique non conforme 78
1. Le médicament 78
1.1. Propriétés pharmacodynamiques 78
1.2. Ses indications 79
1.3. Le principe actif 79
2. Description de l'évènement 80
3. Investigation 81
3.1. Rappel sur le process 81
3.2. Rappel sur les TRA 81
3.3. La revue du dossier de TRA 81
3.4. Les microorganismes 85
3.5. Monitoring microbiologique de l'environnement et du personnel 86
3.6. Monitoring particulaire 90
3.7. Analyse de la cause racine 90
3.8. Conclusion sur les causes probables 94
3.9. Revue des déviations et réclamations 95
3.10. Conclusions de l'investigation 96
4. Plan d'actions 96
4.1. Actions à court terme 96
4.2. Actions à long terme 97
5. Suivi du plan d'actions 97
6. Conclusion 98
Conclusion générale 99
ANNEXE 1 - Liste des interventions 100
ANNEXE 2 - Tableaux de criticité 101
Table des figures 103
Table des tableaux 104
Bibliographie 105

Glossaire

AQP : Assurance Qualité Produit

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

CAPA : *Corrective Action Preventive Action*

GMP : *Good Manufacturing Practice*

PA : Principe Actif

PNR : Pot à Niveau Régulé ou cuve tampon

PSO : Produit Semi-Ouvré

RABS : *Restricted Access Barrier System*

SOP : S*tandard Operating Procedures*

TIL : Test d'Intégrité en Ligne

TRA : Test de Remplissage Aseptique ou MFT : *Media Fill Test*

UFC : Unité Formant Colonie

Introduction

Les préparations injectables sont des préparations stériles, c'est-à-dire exemptes de contaminants microbiens, particulaires et pyrogènes. Les préparations injectables ne pouvant être stérilisées dans leur récipient final doivent être réparties de façon aseptique. A l'heure de l'utilisation des technologies barrières et des isolateurs avec l'atteinte d'un objectif « zéro germe », la découverte d'une contamination dans une zone conventionnelle de répartition aseptique de médicament injectable interroge immédiatement et relève désormais du « cas particulier ». La gestion de salles conventionnelles bénéficie ainsi de cette avancée « aseptique ». Pour arriver à un niveau équivalent de maîtrise de l'environnement des zones aseptiques conventionnelles, les opérateurs font preuve d'une compétence professionnelle accrue et démontrent au quotidien leur grande rigueur d'exécution.[1]

L'objectif est de présenter une démarche pour l'investigation et l'analyse d'une non-conformité d'un Test de Remplissage Aseptique (TRA) en termes de recherche de cause racine, d'éléments décisionnels à réunir et de plan d'actions à mettre en place dans une démarche d'amélioration continue. L'enjeu de la maîtrise de la contamination de produits conventionnels est de protéger le produit fabriqué et donc le patient.

Dans une première partie, la production aseptique des préparations injectables sera présentée. Pour ceci, les caractéristiques des préparations injectables seront rappelées. La notion de zones à atmosphère contrôlée sera traitée, zones caractérisées par différentes classes de propreté selon l'opération réalisée, et déclinables en différents types d'enceintes : zone conventionnelle, RABS et isolateur. Le processus de fabrication d'une solution injectable conventionnelle sera ensuite expliqué pour finir avec les contrôles en cours de production, analytiques et biologiques.

La seconde partie traitera de la maîtrise de la contamination. La définition de la contamination, sa typologie et ses sources et vecteurs seront exposés. Le contrôle de l'environnement étant

aussi important que le contrôle du produit en lui-même, le monitoring environnemental associé au travail en ZAC sera présenté. Les principes généraux de maîtrise seront ensuite cités. En réponse à l'émission de contaminants, le nettoyage et la désinfection seront traités. Le principe de la validation du process et de l'aseptie sera expliqué car il permet de démontrer que le process conduit à l'obtention de médicaments répondant aux caractéristiques demandées. Enfin le principe de gestion des anomalies par l'émission de déviation et la mise en place de CAPA en réponse à ces anomalies sera traité.

La troisième partie correspond à une analyse de situation : la gestion d'un test de remplissage aseptique non conforme. Un rappel du contexte sera réalisé puis la non-conformité sera décrite et le cheminement de l'investigation sera détaillé. Suite à cette anomalie, un plan d'action a été déployé et suivi.

Une conclusion sur ce cas pratique sera donnée, suivie d'une conclusion générale sur l'ensemble de ce travail.

Partie I – Production aseptique des préparations injectables

1. Les préparations injectables

1.1. Généralités

D'après l'article L.5111-1 du Code de la Santé Publique [2] « On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique».

L'administration parentérale correspond à l'introduction du médicament dans l'organisme par effraction du tissu cutané à l'aide d'instruments adéquats. Le médicament est ainsi déposé à l'intérieur d'un tissu ou déversé dans le torrent circulatoire. Les principales voies d'administration sont la voie intra dermique (ID), la voie sous cutanée (SC), la voie intramusculaire (IM) et la voie intraveineuse (IV), présentes de façon schématique sur la figure 1. Il existe également d'autres voies dont les voies intrarachidienne, intra articulaire et intra cardiaque.

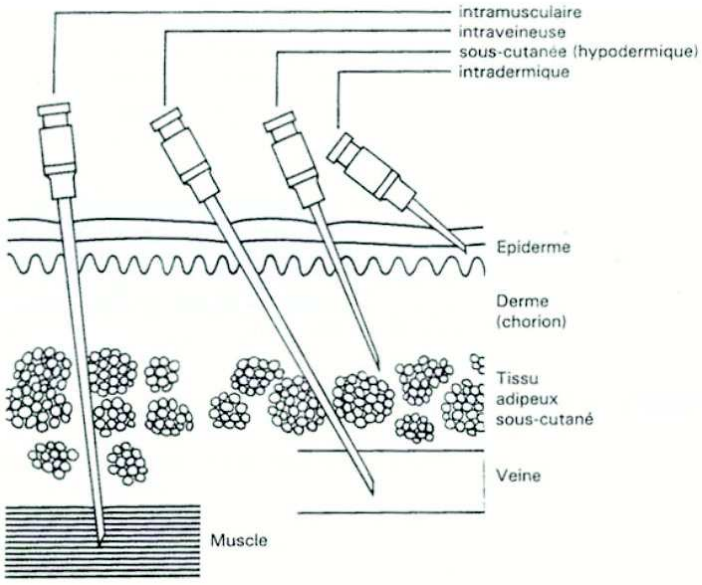


Figure 1 : Les principales voies d'administration parentérale [3]

Les intérêts de l'utilisation de la voie parentérale sont [4]:

- La rapidité d'action car pas de phase d'absorption ou phase minimisée,
- La biodisponibilité optimale ou maximale avec peu ou pas de dégradation du principe actif (PA),
- L'administration de produits non absorbables ou dégradables par d'autres voies,
- Le traitement de patients inconscients.

Les inconvénients de l'administration par voie parentérale sont :

- La douleur à l'injection,
- Le traitement difficile en ambulatoire,
- Le recours à un personnel qualifié pour l'administration.

1.2. Caractéristiques

Les préparations injectables correspondent à la plus grande classe des préparations parentérales. Elles correspondent à des solutions, émulsions ou suspensions stériles contenant un principe actif (PA) et des excipients.

1.2.1. Composition

1.2.1.1. La substance active

Il s'agit de la substance présente dans le médicament qui lui confère ses propriétés pharmacologiques. Elle peut être d'origines variées : extrait de sources naturelles, synthétisé par voie chimique, ou hémi-synthétique ou encore d'origine biologique. La voie chimique permet la synthèse de petites molécules alors que les biotechnologies permettent l'obtention de macromolécules difficilement synthétisables.

1.2.1.2. Les excipients

L'excipient désigne toute substance autre que le principe actif présente dans un médicament. Ce sont des substances inactives pharmacologiquement permettant d'assurer la mise en forme pharmaceutique, la stabilité ou la diffusion du principe actif dans l'organisme. Les excipients utilisés pour les préparations injectables sont majoritairement des solvants. Le principal solvant

utilisé est l'eau pour préparation injectable (EPPI) mais il est possible d'utiliser un liquide non aqueux stérile ou un mélange des deux.

L'EPPI est inscrite à la Pharmacopée Européenne, 9ème édition, et est obtenue par distillation.

Les solvants non aqueux sont utilisés lorsque le principe actif est peu soluble ou insoluble dans l'eau. Ils ne peuvent pas être administrés en IV comme seul excipient. Il existe deux catégories de solvants non aqueux : ceux miscibles à l'eau (éthanol, glycérol, propylène glycol, macrogols 200 et 400) et ceux non miscibles à l'eau (huiles naturelles d'arachide, de soja, d'olive et huiles semi-synthétiques comme l'oléate d'éthyle).

1.2.2. Le conditionnement

Le rôle du conditionnement ou emballage est de protéger et conserver le médicament jusqu'à son utilisation. Il permet également de faciliter l'usage du médicament pour augmenter son efficacité ou sa sécurité d'utilisation. Il permet enfin d'identifier le médicament, d'informer le patient via un étiquetage réglementé, des notices et modes d'emploi et d'assurer la traçabilité pour l'industriel. Il existe trois types de conditionnement : primaire, secondaire et tertiaire. Dans le cadre de cette thèse, seuls les conditionnements primaire et secondaire seront abordés.

1.2.2.1. Les articles de conditionnement primaire

Les articles de conditionnement primaire sont les composants directement en contact avec le produit. Ils doivent être fabriqués dans un matériau (verre ou matières plastiques) suffisamment transparent pour permettre la vérification de l'aspect visuel du contenu (sauf pour les produits photosensibles). Le matériau doit également être inerte vis-à-vis de la préparation et étanche.
Pour les préparations injectables les différents types de conditionnements sont les ampoules, les flacons, les poches et les cartouches et seringues pré-remplies (figure 2).

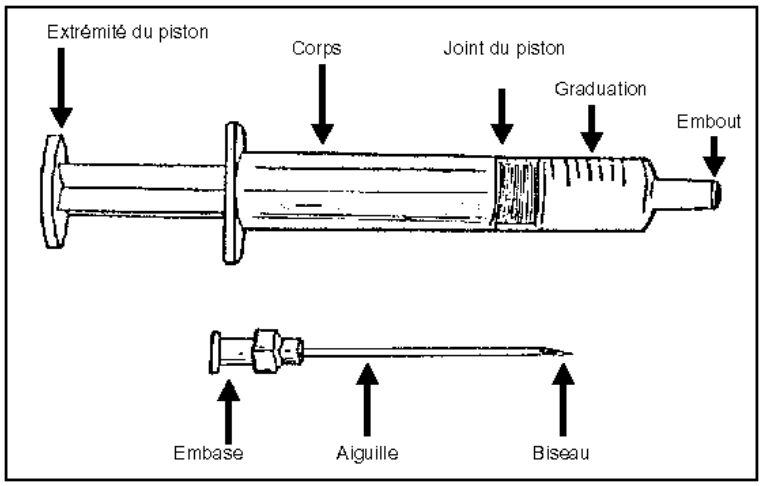


Figure 2 : Les éléments d'une seringue pré-remplie [5]

1.2.2.2. Les articles de conditionnement secondaire

Les articles de conditionnement secondaire sont les composants en contact avec les articles de conditionnement primaire. Il existe 3 types de conditionnement secondaire pour les seringues :

- Le conditionnement souple (sachet papier),
- Le conditionnement semi-rigide (blister pelable),
- Le conditionnement rigide (tube rigide).

Les mentions les plus courantes présentes sur le conditionnement secondaire sont indiquées sur la figure 3 :

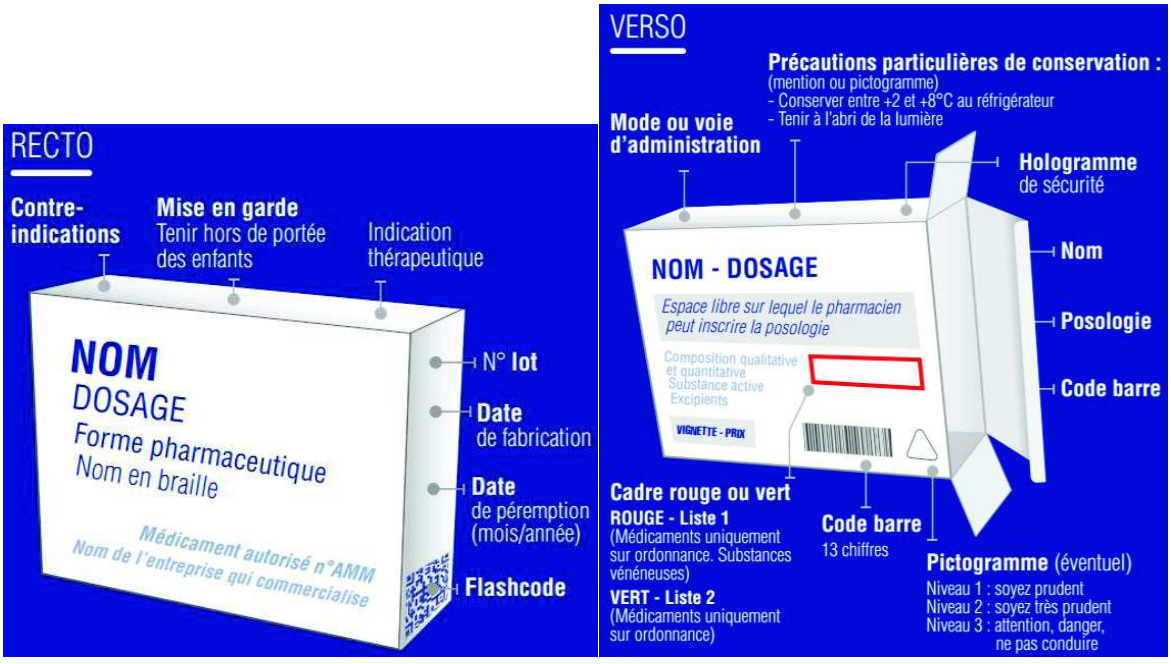


Figure 3 : Mentions présentes sur l'étui [6]

Les mentions portées sur l'étui sont toutes reprises dans la notice avec plus de détails. La notice comporte des informations supplémentaires, parmi lesquelles les effets indésirables, qu'il est important de lire avant l'administration du médicament.

1.2.3. Qualités requises pour les préparations parentérales

1.2.3.1. La stérilité

Les préparations parentérales et les instruments utilisés doivent être stériles. La stérilité au sens général correspond à l'absence de tout microorganisme vivant (bactérie végétatives, spores, champignons). Pour les produits pharmaceutiques selon les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), la stérilité correspond à l'absence d'entités capables de survivre et/ou de se multiplier.

L'état de stérilité absolue, c'est-à-dire un nombre de germe égal à 0 n'est pas réalisable car l'inactivation des microorganismes suit une courbe exponentielle. La population de germes revivifiables tend vers 0 si t tend vers l'infini, comme l'illustre la figure 4. Il existe ainsi toujours une probabilité statistique qu'un microorganisme survive à la stérilisation. La Pharmacopée Européenne a donc introduit la notion de Niveau d'Assurance de Stérilité (NAS). Le NAS est atteint quand une seule unité non rigoureusement stérile pourrait être présente sur une population de 1 million d'unité (soit un NAS = 10^{-6}). Pour augmenter les chances de parvenir à une stérilisation satisfaisante il faut donc que la charge bactérienne de la préparation, appelée *Bioburden* soit la plus faible possible.

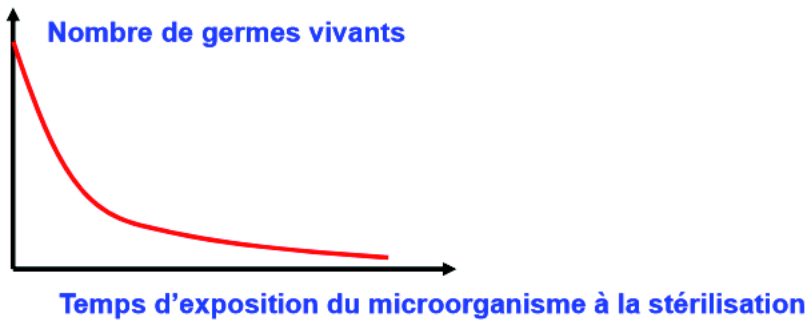


Figure 4 : Courbe de survie pour un microorganisme donné à une température donnée [4]

1.2.3.2. L’absence de pyrogènes

Les pyrogènes peuvent être des endotoxines bactériennes. Ces dernières sont des toxines contenues dans la paroi de certaines bactéries et libérées en général lorsque la bactérie meurt. Les pyrogènes peuvent également être des particules de substances chimiques ou particules métalliques susceptibles de provoquer par injection une brusque élévation de température chez les patients.

1.2.3.3. L’isotonie au plasma

L’isotonie au plasma consiste à avoir une concentration en solutés égale à celle du plasma afin de ne pas entraîner de phénomènes osmotiques tels que la plasmolyse (fuite d’eau des hématies en cas d’injection de préparation hypertonique) ou l’hémolyse (entrée d’eau dans les hématies suite à une injection de préparation hypotonique).

1.2.3.4. La limpidité

La limpidité est requise pour les solutions parentérales. La limpidité correspond à l’absence de particule visible soit à l’œil nu, soit au moyen de dispositifs d’observation adéquats.

1.2.3.5. La tolérance

Les préparations parentérales doivent avoir un pH compatible avec la stabilité du PA mais aussi avec l’absence de douleur à l’injection. Il doit pour cela se rapprocher du pH physiologique qui est de 7,4 et être compris entre 3 et 9.

1.2.3.6. La stabilité et bonne conservation

Au cours de la conservation, le PA ne doit pas se dégrader ou être contaminé par des bactéries.

1.3. Techniques de stérilisation des préparations injectables

Il existe deux grandes approches pour la stérilisation : les procédés de destruction des microorganismes dans la préparation terminale et les procédés d’élimination des microorganismes.

1.3.1. Les procédés de destruction des microorganismes

Les procédés de destruction visent à détruire les microorganismes. Le traitement terminal de la préparation avec les procédés de destruction sont utilisés dans les cas où les PA ou PF n'y sont pas sensibles. On distingue deux modes de destruction soit par des moyens physiques, soit par des moyens chimiques.[4 7]

1.3.1.1. Destruction par des moyens physiques : chaleur ou rayonnements ionisants

Ils existent trois types de destruction par des moyens physiques :

- La chaleur humide,
- La chaleur sèche,
- Les rayonnements ionisants.

Le principe de la stérilisation par la chaleur humide ou autoclavage consiste à placer dans une enceinte étanche appelée autoclave le produit à stériliser et à le soumettre à de la vapeur d'eau surchauffée, ou à un ruissellement d'eau surchauffée, à température élevée, sous une pression contrôlée, pendant un temps déterminé. Les conditions de référence prescrites par la Pharmacopée Européenne sont une température ≥ 121°C pendant un temps ≥ 15 minutes. Cette technique est la technique de référence selon la Pharmacopée Européenne.

Le principe de la stérilisation par la chaleur sèche consiste à placer le produit à stériliser dans une enceinte étanche appelée four, et de le soumettre à de l'air filtré sur filtre HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) et chauffé. Les conditions de référence sont 160°C pendant 2 heures. Des températures supérieures à 220°C peuvent également être appliquées lors de la stérilisation et dépyrogénisation de flacons en verre.

Le principe de la stérilisation par les rayonnements ionisants (bêta ou gamma) consiste à exposer le produit à un rayonnement ionisant provenant d'un radio isotope ou d'un faisceau électronique énergisé par un accélérateur d'électrons. Le rayonnement provoque ainsi une ionisation directe de l'ADN ou des enzymes du microorganisme ou provoque indirectement les

mêmes effets par production de radicaux libres. Cette stérilisation peut cependant générer des modifications de propriétés chimiques, physiques ou mécaniques.

1.3.1.2. Destruction par des moyens chimiques : substances toxiques

Cette méthode expose des objets à des gaz tels que l'oxyde d'éthylène, le formaldéhyde, le glutaraldéhyde, l'oxyde de propylène, le peroxyde d'hydrogène et l'acide peracétique. La méthode au gaz la plus couramment utilisée est celle à l'oxyde d'éthylène car ses propriétés pénétrantes sont plus importantes. C'est un éther cyclique qui va alkyler les acides nucléiques des microorganismes. L'utilisation des gaz pour la stérilisation tend cependant à disparaître car à risque. En effet l'oxyde d'éthylène est inflammable et explosif, des précautions doivent donc être prises. Il est souvent utilisé avec des gaz inertes tels que le dioxyde de carbone pour éviter les incendies et explosions. Il est également possible d'utiliser l'acide peracétique qui est un oxydant biocide. Il est efficace dans l'élimination des contaminants par la destruction de leur paroi cellulaire.

La majorité des préparations injectables sont des préparations contenant des PA thermolabiles pour lesquelles la stérilisation dans leur récipient final, par des moyens physiques ou chimiques, ne peut s'appliquer sans dégradation de l'activité de leur PA. Ces méthodes de stérilisation sont donc essentiellement utilisées pour la stérilisation du matériel entrant en ZAC et des ACP.

1.3.2. Les procédés d'élimination des microorganismes

Les procédés d'élimination permettent eux de séparer les microorganismes d'un fluide. Les microorganismes sont éliminés par filtration stérilisante. La filtration stérilisante permet de séparer les microorganismes du produit à l'aide d'un média filtrant de porosité $\leq 0{,}22$ µm.

Les précautions à respecter pour la réalisation d'une filtration stérilisante satisfaisante sont :

- Procéder au préalable à une filtration clarifiante (0,45 µm) afin d'éliminer les plus grandes particules et ne pas colmater le filtre stérilisant,

- Disposer d'une charge bactérienne de départ la plus faible possible,
- Utiliser des filtres, du matériel et des récipients stériles,
- Filtrer sous pression à l'aide d'un gaz stérile (azote stérile),
- Conditionner le produit stérile en zone classée A,
- Filtrer rapidement les médicaments après leur fabrication.

La filtration stérilisante est applicable aux produits thermolabiles, ne pouvant être stérilisés dans leur emballage terminal. La stérilisation par filtration stérilisante doit cependant être accompagnée d'une préparation et répartition aseptique en Zone à Atmosphère Contrôlée (ZAC) pour éviter les risques de contamination.

Le choix de la forme de la préparation parentérale et de la technique de stérilisation va ainsi dépendre de la nature et de la stabilité du PA aux températures élevées et en solution. Si le PA est stable à la chaleur et en solution, la stérilisation du produit dans son conditionnement final sera possible. Si le PA est stable en solution mais instable à la chaleur, la technique utilisée sera la filtration stérilisante suivie d'une répartition aseptique. Si le PA est instable à la chaleur et en solution, la préparation passera par une filtration stérilisante et répartition aseptique puis sera lyophilisée. Si la forme est une dispersion (émulsion ou suspension), le PA et le véhicule seront stérilisés séparément puis seront répartit aseptiquement. Si le PA n'est pas stable en solution la lyophilisation sera alors privilégiée.

2. Les Zones à Atmosphère Contrôlée

La fabrication des médicaments stériles s'effectue dans des zones à atmosphère contrôlée. Ces ZAC imposent des exigences particulières selon la classe de propreté et le type d'enceinte permettant une séparation personnel / produit / composants franche ou non.

2.1. Différentes classes de propreté

Les ZAC destinées à la fabrication des produits stériles sont classées selon les qualités requises pour leur environnement. Chaque opération de fabrication requiert un niveau approprié de propreté de l'environnement « en activité » de façon à réduire au minimum le risque de contamination particulaire ou microbienne des produits ou des substances manipulés. Afin de satisfaire aux conditions requises "en activité ", ces zones doivent être conçues de manière à atteindre des niveaux définis de propreté de l'air "au repos". L'état "au repos", est l'état où les locaux sont opérationnels avec le matériel de production en place, sans que les opérateurs soient à leur poste. L'état "en activité", est l'état dans lequel les locaux et les équipements fonctionnent selon le mode opératoire défini et en présence du nombre prévu d'opérateurs. Les états « en activité » et « au repos » doivent être définis pour chaque ZAC.

Pour la fabrication de médicaments stériles, on distingue quatre classes de zones à atmosphère contrôlée selon les opérations, comme résumé dans le tableau 1 :

- Classe A : Les points où sont réalisées des opérations à haut risque, tels que le point de remplissage, les bols de bouchons, les points de raccordements aseptiques. Les postes de travail sous flux d'air laminaire doivent normalement garantir les conditions requises pour ce type d'opérations. Les systèmes de flux d'air laminaire doivent délivrer de l'air circulant à une vitesse homogène de 0,36 – 0,54 m/s (valeur guide) dans les systèmes non clos. Le maintien de la laminarité du flux doit être démontré et validé. Un flux d'air unidirectionnel et des vitesses inférieures peuvent être utilisés dans les isolateurs clos et dans les systèmes clos type « boîte à gants ».

- Classe B : Pour les opérations de préparation et de remplissage aseptiques, cette classe constitue l'environnement immédiat d'une zone de travail de classe A en zone conventionnelle.
- Classes C et D : ZAC destinées aux étapes moins critiques de la fabrication des médicaments stériles.

Tableau 1 : Classe requise selon l'opération sur des préparations aseptiques [8]

Classe	Opérations sur des préparations aseptiques
A	Préparation et remplissage aseptiques.
C	Préparation de solution destinées à être filtrées.
D	Manipulation d'accessoires après nettoyage.

Dans les tableaux 2 et 3, sont indiquées les limites autorisées/recommandées de concentration particulaire et contamination microbiologique.

Tableau 2 : Concentration maximale autorisée de particules en suspension dans l'air [8]

	Au repos		En activité	
Classe	Nombre maximal autorisé de particules par m^3 de taille égale ou supérieure aux tailles précisées.			
	0,5 µm (d)	5 µm	0,5 µm (d)	5 µm
A	3520	20	3520	20
B	3520	29	352000	2900
C	352000	2900	3520000	29000
D	3520000	29000	Non défini	Non défini

Tableau 3 : Limites recommandées de contamination microbiologique [8]

Classe	Echantillon d'air ufc/m^3	Boîte de Pétri (diam. : 90 mm), UFC / 4heures	Gélose de contact (diam. : 55mm), ufc/plaque	Empreintes de gant (5doigts) ufc/gant
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

La « séparation personnel / produit / composants » plus ou moins franche se décline en différents types d'enceintes :

- Zone conventionnelle,
- *Restricted Access Barrier Systems* (RABS),
- Isolateurs.

2.2. Différentes enceintes

Selon les BPF, l'entrée dans les ZAC doit se faire par des sas réservés au personnel et/ou au matériel et aux substances. Les ZAC doivent être maintenues à un niveau de propreté approprié et alimentées en air filtré sur des filtres d'efficacité correspondant au niveau de propreté requis. Les différentes opérations de préparation des accessoires, de préparation du produit et de remplissage doivent être effectuées dans des locaux séparés au sein de la ZAC. Pour cette séparation des locaux et des activités, différentes techniques existent aujourd'hui.

2.2.1. Zone conventionnelle

La zone conventionnelle est une salle blanche également appelée salle propre. « Salle dans laquelle la concentration de particules en suspension dans l'air est maîtrisée et qui est construite et utilisée de façon à minimiser l'introduction, la production et la rétention de particules à l'intérieur de la pièce et, dans laquelle d'autres paramètres pertinents tels que la température, l'humidité et la pression sont maîtrisés comme il convient. ».

Caractéristiques fonctionnelles d'une zone conventionnelle [9]:

- Contact possible entre le personnel et le produit,
- Barrière non étanche,
- Habillage du personnel devant être adapté aux fabrications et aux zones de travail,
- Consommation d'énergie importante liée à l'utilisation de pressions différentielles et de systèmes de traitement d'air complexes,
- Grande liberté de manipulation du matériel de procédé.

2.2.2. RABS (Restricted Access Barrier Systems)

Le RABS est une évolution de la salle blanche traditionnelle avec pour objectif, l'amélioration du niveau d'assurance de stérilité. Cette technologie, consiste à installer des séparations rigides entre la zone critique du procédé et la zone réservée aux opérateurs. Cette séparation est cependant non stricte et l'environnement reste identique à une salle conventionnelle.

Il existe différents types de RABS : ouvert ou fermé, actif ou passif. Les caractéristiques fonctionnelles restent identiques.

Caractéristiques fonctionnelles d'un RABS (ouvert actif sur la figure 5) [10] :

- Barrière physique avec flux d'air unidirectionnel,
- Environnement intérieur classe A (ISO 4.8),
- Environnement extérieur classe B (ISO 7),
- Décontamination avec agent sporicide possible mais en même temps que la salle,
- Refoulement de l'air dans la salle,
- Gants pour intervention dans la zone critique du procédé,
- Ouverture possible des portes en production sous conditions.

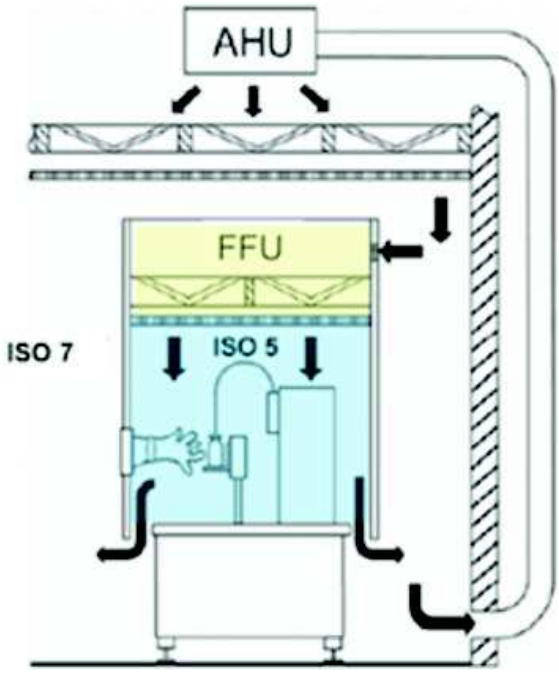


Figure 5 : Exemple de RABS ouvert actif [10]

2.2.3. Isolateur

L'isolateur, à la différence des précédentes enceintes, crée un espace de confinement aseptique maîtrisé dans lequel les étapes critiques du procédé se déroulent avec une sécurité maximale ; en effet, l'isolateur sépare clairement le procédé de l'opérateur. Il constitue une barrière physique entre le produit et l'opérateur, il est utilisé pour protéger le produit, l'opérateur et l'environnement. En règle générale, il intègre un système automatique de décontamination avec un agent sporicide comme le peroxyde d'hydrogène qui garantit la décontamination de toutes les surfaces internes ce qui renforce la maîtrise des risques de contamination donc le niveau d'assurance de stérilité.

Caractéristiques de l'isolateur (schématisé en figure 6) [10]:

- Barrière physique et étanche avec flux d'air unidirectionnel,
- Centrale de traitement d'air dédiée permettant des conditions spécifiques pour la température et l'humidité,
- Environnement intérieur classe A (ISO 4.8),
- Environnement extérieur C / D (ISO 8),
- Décontamination automatique avec agent sporicide,
- Surpression ou dépression dans la zone critique possible par rapport à l'extérieur,
- Ouverture interdite des portes durant la production.

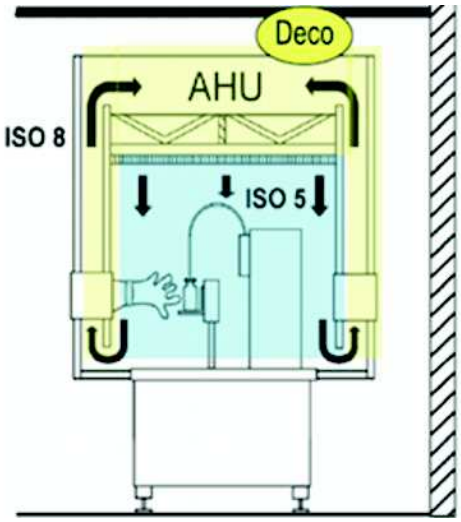


Figure 6 : L'isolateur [10]

Le niveau d'assurance de stérilité augmente avec le RABS et davantage encore avec l'isolateur, cependant pour des raisons économiques et historiques les zones conventionnelles demeurent utilisées.

3. Le processus de fabrication des solutions injectables

Les opérations stériles sont constituées de différentes étapes successives :

- La préparation du matériel,
- La fabrication de la solution,
- Le remplissage des seringues.

3.1. Préparation du matériel

Tout le matériel en contact avec le produit ou entrant en zone aseptique doit au préalable de son utilisation être lavé avec de l'eau purifié puis rincé avec de l'EPPI et séché. Ces étapes peuvent être précédées d'un bain à ultrasons afin de décoller d'éventuelles particules. Le matériel est ensuite monté si besoin, et ensaché. Toutes ces étapes ont lieu en ZAC de classe D. Une fois prêt, le matériel est stérilisé. La méthode la plus commune est l'autoclavage. Une fois autoclavé, le matériel est déchargé en ZAC de classe B où il est stocké en attente d'utilisation.

Des tests d'intégrité sont menés, avant autoclavage et après utilisation, sur les évents (pour la filtration des gaz) et cartouches filtrantes (1ère et 2nde filtration de la solution) utilisés lors de la préparation de la solution et du remplissage.

Les médias filtrants qui composent les cartouches et évents sont :

- Le polytétrafluoroéthylène (PTFE)
- Le fluorure de polyvinylidène hydrophobe (PVDF)

Les méthodes qui existent pour le contrôle de l'intégrité sont les tests de point de bulle, de diffusion ou de maintien de pression. Le matériel est ensuite envoyé dans les blocs de division via des sas à différentiel de pression pour éviter la contamination du bloc.

Remarque : L'intégrité des filtres stérilisés est également contrôlée directement sur la ligne de répartition, au démarrage de la division. Ce test est appelé TIL (Test d'Intégrité en Ligne). Il permet de s'assurer que la cartouche n'a pas été dégradée lors de l'autoclavage.

3.2. Préparation de la solution

La fabrication, schématisée dans la figure 7, est l'étape de pesée du principe actif et de mise en solution de ce dernier avec un solvant dans une cuve de fabrication en ZAC classe C. La solution doit être préparée aseptiquement afin de limiter au maximum le *biodurden* mesuré avant la filtration. La conformité de l'eau pour préparation injectable doit également être contrôlée. La cuve est ensuite mise en filtration stérilisante sous flux classé A à l'aide d'une cartouche filtrante, constituée d'un filtre de 0,22µm qui permet de retenir les particules et les microorganismes. L'intervalle de temps entre le début de la préparation de la solution et sa filtration sur un filtre est validé. La durée de filtration d'un volume connu de solution et la différence de pression entre l'entrée et la sortie du filtre doivent être suivis. Ces facteurs sont déterminés pendant la validation. Toute divergence significative durant le processus habituel de fabrication doit être noté et examinée.

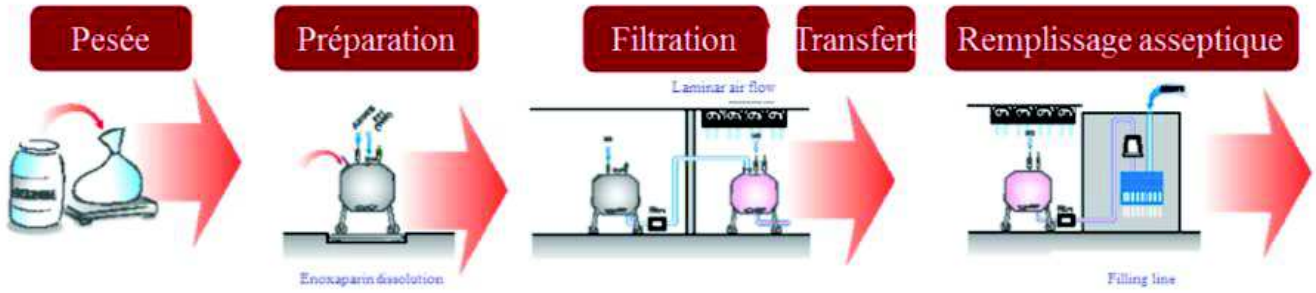


Figure 7 : La préparation de la solution [11]

Pour la maîtrise de la stérilisation par filtration stérilisante, 3 conditions principales sont requises :

- Assurer un niveau de contamination du produit à filtrer le plus faible possible en contrôlant sa biocharge,
- Garantir pendant la filtration le maintien des paramètres en dessous des maximas validés pour la pression, le débit et la durée de filtration,
- Effectuer la vérification de l'intégrité des filtres en place après stérilisation selon les paramètres validés (point de bulle ou test de diffusion) avant et après usage.

3.3. Répartition aseptique en zone conventionnelle

Elle est composée de 4 sous-étapes :

- La pulvérisation,
- L'introduction tub,
- La répartition,
- La sortie poumon.

Lors du remplissage, les seringues sont livrées dans un conditionnement temporaire appelé le tub comme montré en figure 8. C'est un support qui permet le transport et l'identification des seringues. Le tub contient une grille appelée nest supportant les seringues.



Figure 8 : Un tub contenant un nest portant des seringues [11]

3.3.1. La pulvérisation

La pulvérisation correspond à l'étape pendant laquelle le tub se prépare à entrer en zone classée. Il passe sous un tunnel-convoyeur pulvérisant des désinfectants sur sa sache. Cette 1ère étape, réalisée en zone non classée, permet de diminuer la charge microbienne présente sur la sache externe du tub.

3.3.2. L'introduction tub

L'introduction tub correspond à l'étape d'entrée du tub ensaché dans le bloc de répartition. Il est amené via le convoyeur jusque dans la boîte à gants, endroit où il sera défait de sa sache. L'opérateur est en classe D alors que la boîte à gants, une enceinte étanche, permet des manipulations via des gants en néoprène appelés « manchettes » dans une atmosphère de classe B. Dans cette boîte à gants, les tubs sont débarrassés de leur sache puis envoyés en bloc stérile via un convoyeur.

3.3.3. La répartition

La répartition est l'étape pendant laquelle les seringues seront remplies avec la solution. Une fois passé par la boîte à gants, le tub arrive en répartition via un convoyeur. Ensuite, en classe A dans la doseuse, il est débarrassé de son opercule afin de découvrir les seringues encore vides, désormais totalement exposées à l'environnement classe A. Les tubs sont identifiés dès leur entrée dans la doseuse.

La solution précédemment filtrée se situe dans la cuve de division qui est connectée à la doseuse. La solution alimentée par aspiration passe dans une 2nde cartouche filtrante, aussi appelée filtre de sécurité, immédiatement avant répartition. Un prélèvement de solution pour mesure de la charge bioburden doit également être réalisé pour cette 2nde filtration stérilisation. La solution est ensuite acheminée vers les aiguilles en passant par un pot à niveau régulé ou « PNR » à l'aide de pompes à piston. Le PNR, dont le plan d'implantation est présenté en figure 9, est un réservoir intermédiaire dont le volume de remplissage est régulé par des sondes mini et maxi. La solution peut être placée sous barbotage d'azote afin de limiter son oxydation.

Afin de s'assurer de l'intégrité de la cartouche filtrante après autoclavage, un TIL est réalisé au démarrage de la division avec de l'air. Pour garantir la stérilité du circuit, tout gaz entrant en contact du produit doit passer par un évent ayant une porosité de 0,22 micromètre.

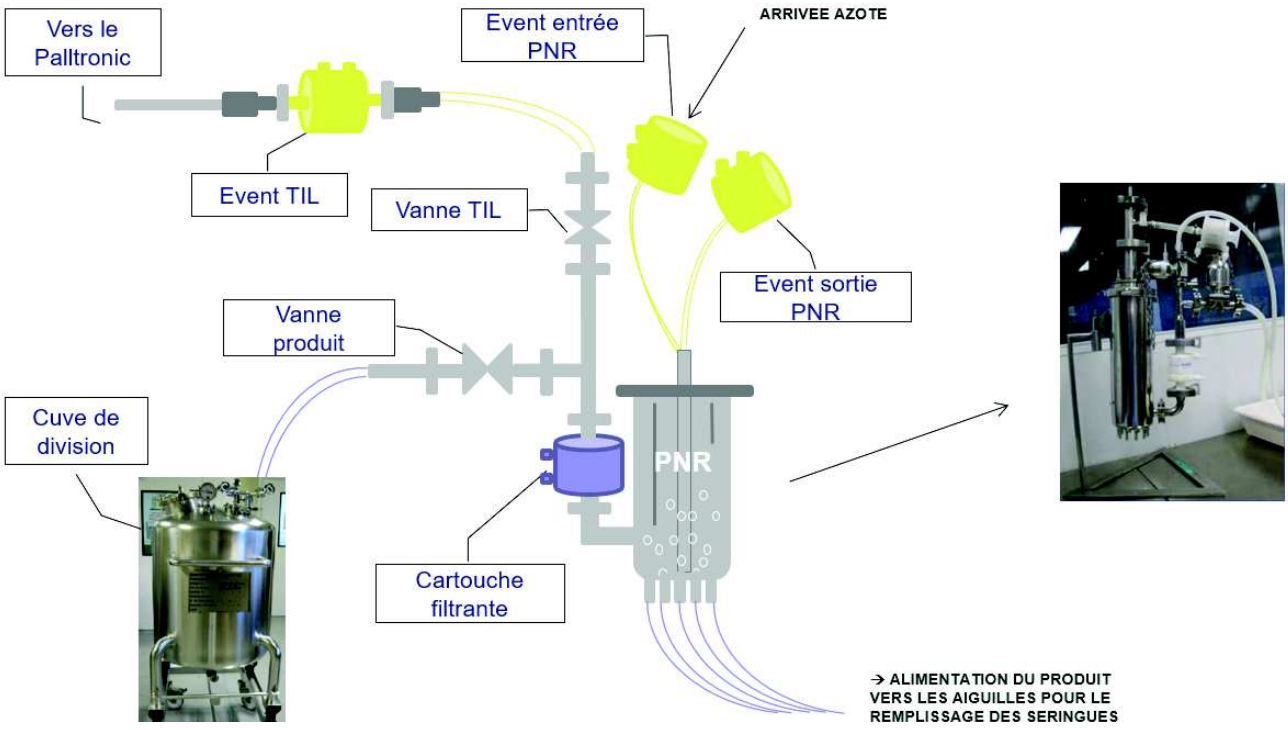


Figure 9 : Plan d'installation du PNR [11]

Les seringues sont remplies dans la doseuse puis le joint de piston ou bouchon est inséré pour assurer son étanchéité et le maintien de la stérilité du produit. La mise en place des joints de piston est permise grâce à la fourchette de retournement et à des couples de tubes et poussoirs.

Le fonctionnement du bouchage est schématisé avec la figure 10 :

Au-dessus du tube d'enfoncement, le poussoir descend sur le joint de piston présenté par la fourchette de retournement. Alors que la fourchette se retire, le poussoir maintenant le joint de piston en place descend encore plus pour qu'il entre dans l'intérieur du tube. Ensuite, l'ensemble formé par le joint de piston, le tube et le poussoir poursuit le mouvement de descente jusqu'à atteindre une position dans la seringue à laquelle le tube doit remonter. A cet instant, le poussoir reste immobile, obligeant ainsi le joint de piston à rester en place à l'intérieur. Le tube remonte ainsi tout en laissant le joint de piston à sa position, maintenu par le poussoir, et enfin le poussoir remonte.

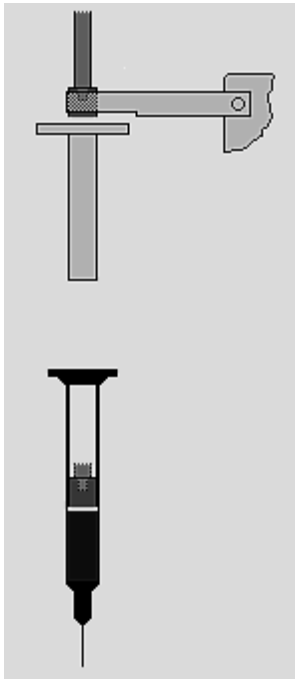


Figure 10 : Le fonctionnement du bouchage [11]

3.3.4. La sortie poumon

Après bouchage, le tub sort du bloc de répartition via un convoyeur et est stocké dans une zone tampon appelée « poumon » en attendant qu'un manutentionnaire mette en chariot ce produit semi-ouvré (PSO).

La figure 11 résume le processus de remplissage.

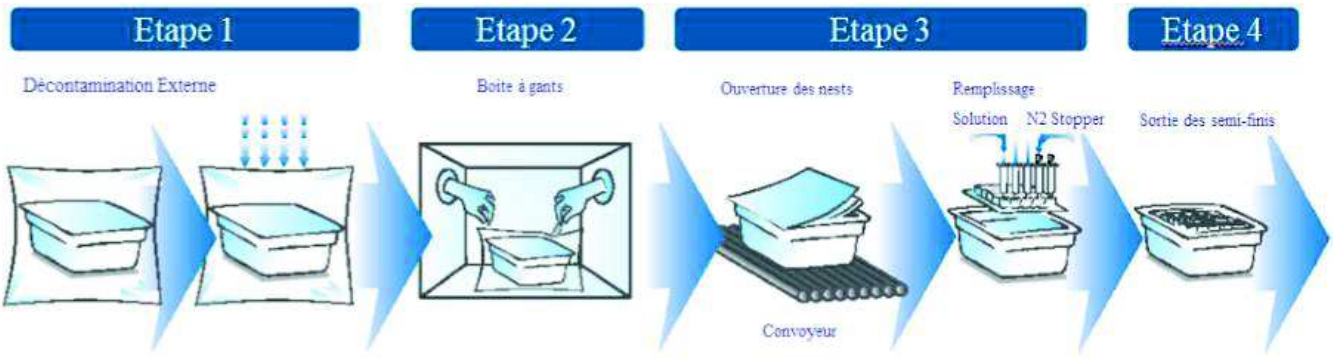


Figure 11 : Le remplissage [11]

Ce PSO sera ensuite miré, conditionné et libéré avant expédition.

3.4. Inspection visuelle et conditionnement

Une fois les seringues remplies et bouchées, elles sont retirées du nest pour passer à l'inspection visuelle. L'inspection visuelle permet de détecter des défauts tels que :

- Les particules,
- La dose, grâce à la hauteur de liquide dans la seringues,
- Les fissures sur la seringue,
- La présence / l'endommagement des joints de piston et de la collerette de la seringue.

Les mireuses peuvent être automatiques ou manuelles. Dans le cas des mireuses automatiques, les seringues passent devant une dizaine de caméras par convoyeur. Les caméras sont prévues pour repérer des défauts différents répertoriés ci-dessus. En cas de rejets importants, les rebuts sont mirés une deuxième fois à l'aide d'une mireuse manuelle où des opérateurs sont formés à repérer les défauts à l'œil nu dans des conditions particulières, notamment de luminosité comme décrit dans la Pharmacopée Européenne [12].

Le conditionnement est la dernière étape de la production. Le piston est ajouté à la seringue, avec son système de sécurité, puis cette dernière est étiquetée et conditionnée en blister via une thermoformeuse. Une encartonneuse ajoute l'étui et la notice et enfin l'encaisseuse arrive en dernière étape avant la mise sur palette, le filmage et l'envoi au magasin. Le produit fini est alors prêt à être libéré et expédié. L'inspection visuelle et le conditionnement sont schématisés sur la figure 12 :

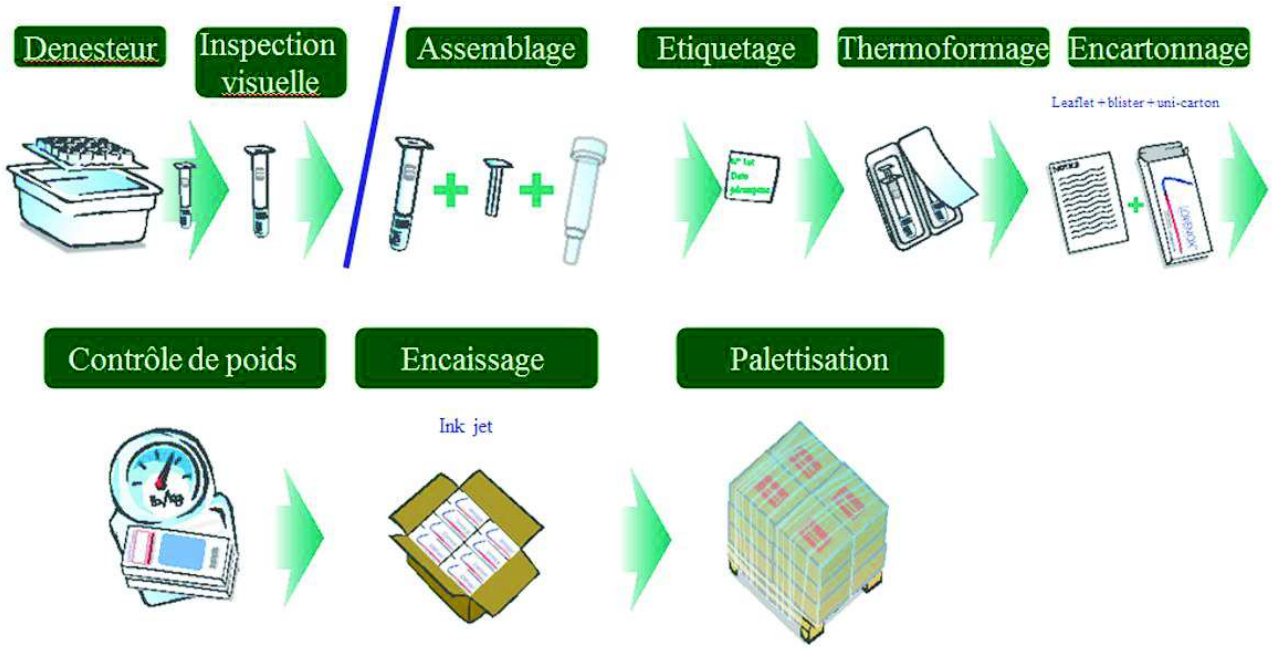


Figure 12 : Exemple de process allant de l'inspection visuelle au conditionnement [11]

4. Contrôles de la qualité des injectables

Selon les BPF chapitre 1 [13]: « Le contrôle de la qualité concerne l'échantillonnage, l'établissement de spécifications et l'analyse, ainsi que l'organisation, l'établissement des documents et des procédures de libération qui garantissent que des essais nécessaires et appropriés ont bien été effectués, que les matières premières et les articles de conditionnement ne sont pas libérés pour la fabrication, ni les produits finis libérés en vue de leur vente ou de leur distribution, avant que leur qualité n'ait été jugée satisfaisante. »

De nombreux contrôles qualité ont ainsi lieu avant, pendant et après la production d'un médicament stérile, afin de garantir la qualité des produits et la sécurité du patient.

4.1. Contrôles en cours de production

Les contrôles en cours ou *In Process Control* (IPC), sont des contrôles effectués en cours de production par les opérateurs.

4.1.1. Contrôle de masse

Un contrôle de masse est réalisé sur des seringues prélevées à périodicité définie. La solution qu'elles contiennent est pesée sur une balance qualifiée. Les masses sont reportées sur le dossier de lot avec une valeur cible et un écart type à respecter.

4.1.2. Contrôle de la hauteur de bulle

Un contrôle de la hauteur de bulle est réalisé sur une seringue prélevée périodiquement pour chacun des couples pompe/aiguille. La distance entre le joint de piston et le haut de la solution est mesurée. Le résultat est reporté sur le dossier de lot et doit être compris dans les limites de spécifications.

4.1.3. Contrôle des débits d'azote

L'azote est utilisé dans le circuit de remplissage afin d'éviter l'oxydation de la solution. Un débit trop élevé peut cependant entraîner un assèchement et donc une surconcentration de la solution. Un contrôle des débits d'azote est donc réalisé en cours de production. Le résultat est reporté sur le dossier de lot et doit être compris dans les limites de spécifications.

4.1.4. Contrôle particulaire

Un monitoring particulaire du bloc de division est effectué durant la production. Des capteurs mesurent la quantité de particules présente dans l'air puis envoient les données à un poste informatique dédié. Lorsque la quantité de particules en suspension est trop importante, une alarme retentie et les opérateurs présents doivent cesser leurs mouvements jusqu'au retour au niveau spécifié. Les tubs présents dans la doseuse pendant l'alarme sont alors éliminés.

4.2. Contrôles analytiques

Le laboratoire d'analyse physico-chimique a pour rôle de déterminer si les caractéristiques physico-chimiques des produits finis correspondent aux spécifications établies. Les contrôles sont réalisés sur des seringues prélevées statistiquement sur le lot. Plusieurs paramètres sont mesurés, parmi lesquels les caractéristiques des produits administrés par voie parentérale détaillés dans la partie 1.2.3. : « Qualités requises pour les préparations parentérales ».

Parmi les paramètres mesurés, on peut cependant citer les paramètres suivants :

- Caractères organoleptiques : Aspect, couleur du produit,
- Identification spécifique : Techniques de précipitation spécifique de la molécule de principe actif, analyse sous spectre UV,
- Limpidité, coloration de la solution au 2/3, Détermination du pH de la solution, détermination de sa densité, tests d'intégrité, volume extractible des seringues selon les essais de la pharmacopée européenne.

4.3. Contrôles biologiques

Le laboratoire de biologie est en charge de déterminer et suivre l'état de contamination microbiologique de l'environnement des salles classées (surfaces, eaux, air) et du personnel, mais également des limites et mesures à prendre en cas de dépassement. La libération du produit fini sur le marché ne pourra s'effectuer qu'une fois tous ces tests achevés et conformes.

En comparaison à d'autres produits, le contrôle de l'environnement est aussi important que le contrôle du produit en lui-même car garant de sa stérilité. Ce sujet sera développé dans le cadre de la partie II : « Maîtrise de la contamination » de cette thèse.

Partie II – Maîtrise de la contamination

La stérilité de chaque unité ne pouvant être contrôlée, l'assurance de la stérilité va passer par la maîtrise de la contamination de l'environnement.

1. La contamination

1.1. Définition

Selon les BPF[14], une contamination correspond à l'introduction non intentionnelle d'impuretés de nature chimique ou microbiologique, ou de matière étrangère, à l'intérieur ou à la surface d'une matière première, d'un intermédiaire, ou d'une substance active, pendant la production, l'échantillonnage, le conditionnement ou le reconditionnement, le stockage ou le transport. Dans le cadre de cette thèse nous nous intéresserons à la contamination particulaire, microbiologique et chimique pouvant avoir lieu dans un secteur de remplissage aseptique.

1.2. Types de contamination

Les contaminations sont traditionnellement classées en 3 grands types :

- Contamination particulaire,
- Contamination microbiologique,
- Contamination chimique.

1.2.1. Contamination particulaire

Les contaminants particulaires sont des particules ou amas de particules inertes, c'est à dire non viables, de composition physico-chimique complexe et de forme très variée. Ce sont par exemple des peaux mortes, des poussières, des fibres, des particules métalliques ou encore des particules de verre. La plupart du temps, on les assimile à des sphères en volume ou des disques en surface. La taille de ces particules est alors définie par le diamètre ou la dimension du plus grand axe de la particule. Elle s'étend en général du nanomètre au millimètre et est exprimée en micromètre. Le seuil de visibilité des particules en lumière intense est d'environ 30 µm. Ce

seuil est nettement supérieur aux tailles des contaminants habituellement présents dans l'air (figure 13) et donc aux tailles de référence utilisées pour la classification des zones à contamination maîtrisée ou salles propres. La difficulté dans la lutte contre les particules réside par conséquent dans le fait qu'elles sont en grande partie invisibles à l'œil nu. Leur détection requiert un appareillage sophistiqué et une gestion complexe à l'échelle industrielle.

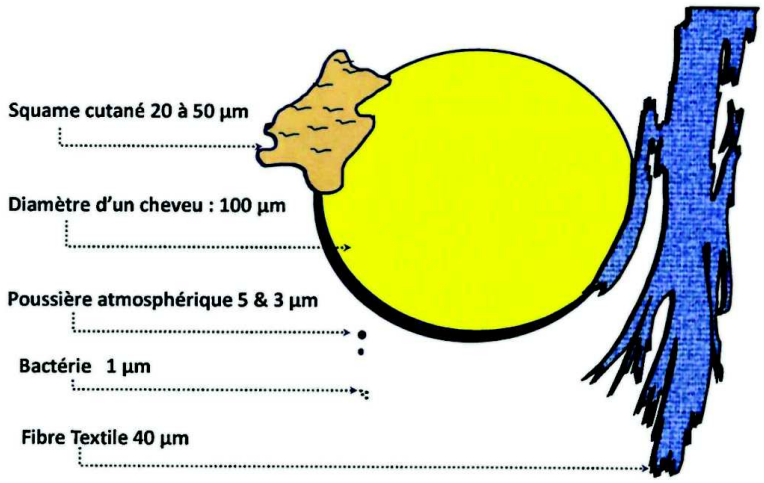


Figure 13 : Exemples de tailles de contaminants fréquemment rencontrés [11]

Le comportement d'une particule dans l'air dépend de sa taille (tableau 4). Plus la particule est grande plus elle sédimente rapidement. Mais en dessous de 50 µm, les particules sont en suspension dans l'air.

Tableau 4 : Comportement des particules en fonction de leur taille [15]

Taille de particule	>50µm	Entre 1 et 50 µm	Entre 0,1 et 1 µm	<0,1 µm
Comportement dans l'air	Sédimentation rapide	Particules maintenues en suspension dans l'air sauf dans un flux laminaire	En suspension dans l'air	Particules se comportant comme des molécules gazeuses (mouvement brownien)

Les particules non viables sont inertes mais peuvent servir de véhicules aux particules viables ou corps vivants et ainsi entraîner une contamination microbiologique. Plus la particule est grande, plus la probabilité qu'elle transporte un microorganisme est importante.

1.2.2. Contamination microbiologique

Une contamination microbiologique correspond à l'introduction de particules viables ou microorganismes. Un microorganisme est un organisme vivant microscopique constitué par une cellule unique ou par un groupe de cellule. Une cellule est une unité biologique structurelle, fonctionnelle et fondamentale des êtres vivants, de taille variable (10 à 100µm). C'est une structure organisée avec deux fonctions principales : une fonction de machinerie grâce à son métabolisme et une fonction de codage, c'est-à-dire de transmission de son information génétique. Physiquement, une cellule est un compartiment cloisonné par une membrane dans lequel sont regroupées toutes les molécules.

Les microorganismes peuvent entres autres être des bactéries, des champignons (levures et moisissures) ou des virus. Les filtres stérilisants utilisés pour la répartition aseptique peuvent retenir les bactéries et les champignons cependant ils ne retiennent pas tous les virus ni les mycoplasmes (bactéries dépourvues de paroi rigide et capable de multiplication autonome).

1.2.2.1. Les bactéries

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires (comme les staphylocoques et streptocoques) ou multicellulaires plus rarement (généralement filamenteuse). Les bactéries peuvent former des colonies dont les cellules restent agglutinées au sein d'un gel muqueux appelé biofilm. Elles présentent de nombreuses formes : sphériques appelés coques, allongées ou en bâtonnets appelés bacilles ou encore des formes plus ou moins spiralées. Leur taille est généralement comprise entre 0,5 et 5 µm. On estime qu'il existe environ 10 000 espèces de bactéries à ce jour. Elles sont présentes dans tous les types de biotopes rencontrés sur Terre. Elles peuvent être isolées du sol, des eaux douces, marines ou saumâtres, de l'air, des profondeurs océaniques, des déchets radioactifs, de la croûte terrestre, sur la peau ou dans l'intestin des animaux. La plupart sont inoffensives ou bénéfiques pour l'organisme. Il existe cependant de nombreuses espèces pathogènes responsables de maladies infectieuses.

Une caractéristique importante des bactéries est leur paroi cellulaire. Malgré la forte pression osmotique qui règne à l'intérieur de leur cytoplasme, la bactérie n'éclate pas grâce à l'existence d'une structure rigide qu'est la paroi cellulaire. La paroi donne ainsi à la bactérie sa forme et permet une protection contre l'éclatement. Les polymères la constituant et leur mode de liaison varient selon les espèces bactériennes. Toutefois, une substance de base, spécifique des bactéries, est partout présente : la muréine, aussi appelée peptidoglycane. La coloration de Gram est un critère empirique permettant de déterminer la structure de la paroi bactérienne. Une observation microscopique après traitement révèle deux groupes (figure 14) :

- Les bactéries à Gram positif, colorées en violet, contenant une membrane plasmique,
- Les bactéries à Gram négatif, colorées en rose, contenant une membrane interne et externe.

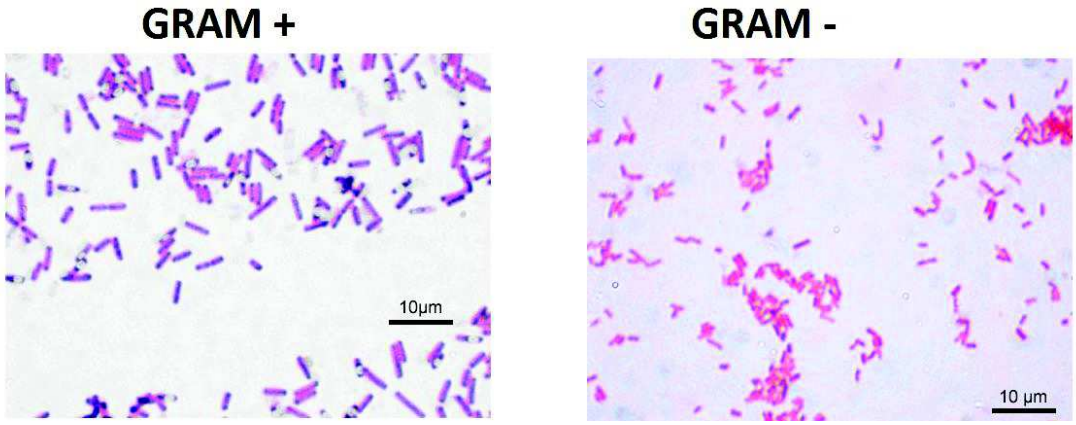


Figure 14 : Coloration de Gram sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif [11]

1.2.2.1.1. Caractéristiques des bactéries à Gram positif et négatif

Les bactéries à Gram positif possèdent de nombreuses couches de peptidoglycane qui représentent jusqu'à 90 % des constituants de la paroi bactérienne (figure 15).

Les bactéries à Gram négatif n'ont qu'une seule ou au plus deux couches de peptidoglycane, ce qui ne représente que 5 à 20 % des constituants de la paroi bactérienne (figure 16). Deux constituants situés en dehors du peptidoglycane viennent compléter la paroi : des lipoprotéines et une membrane externe contenant du lipopolysaccharide et des protéines de surface. Les

lipoprotéines sont le lien entre le peptidoglycane et la membrane externe. Cette dernière est constituée d'une double couche de phospholipides.

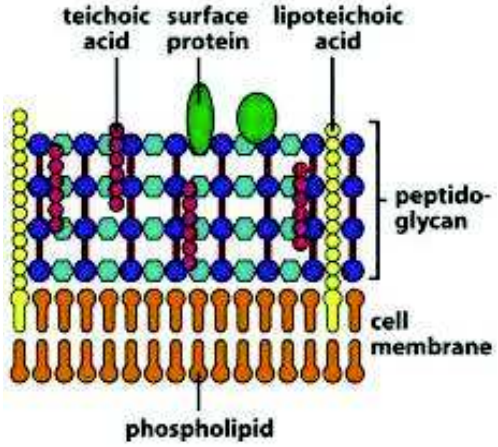


Figure 16 : Structure d'une bactérie à Gram positif

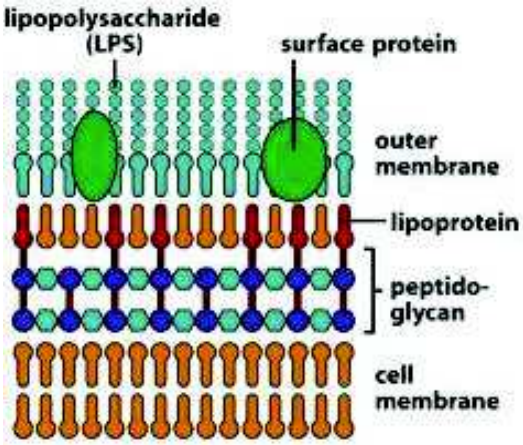


Figure 15 : Structure d'une bactérie à Gram négatif

La figure 17 répertorie les principales familles de bactéries selon les paramètres de la coloration de Gram et leur forme.[16]

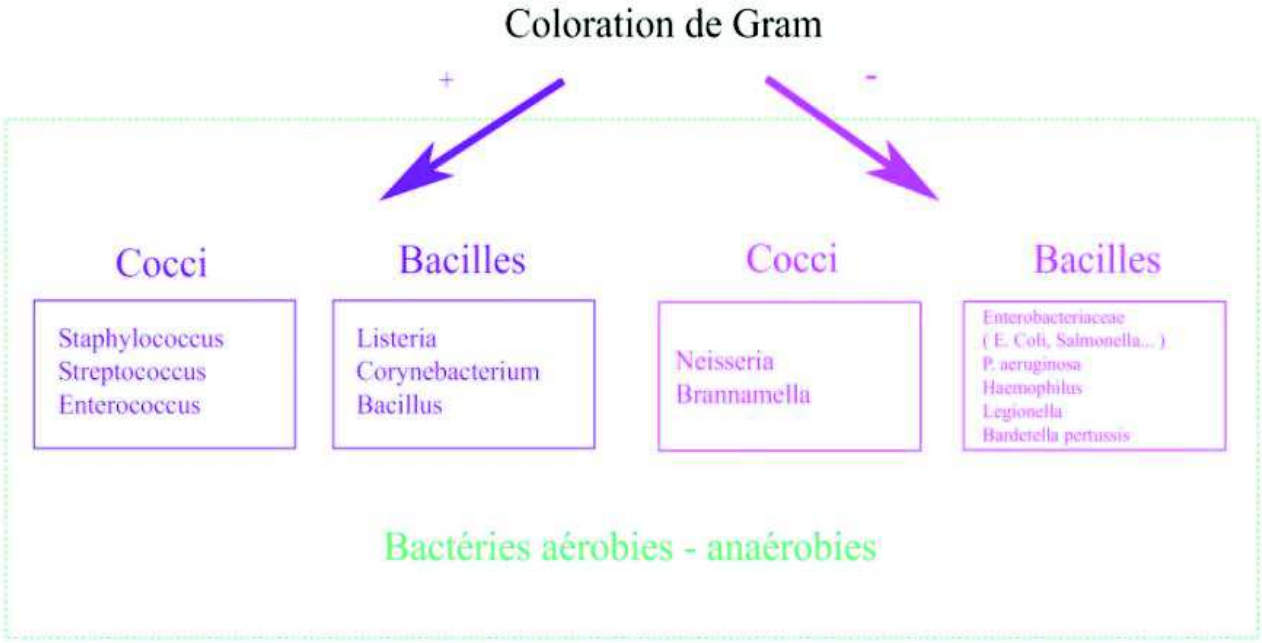


Figure 17 : Principales familles de bactéries [16]

1.2.2.1.2. Les bactéries sporulantes

Une vigilance particulière est apportée aux bactéries sporulantes car elles sont capables de former des endospores. C'est le cas notamment des bactéries appartenant au genre *Bacillus* et au genre *Clostridium.* Les bactéries sporulées subissent un cycle de différenciation en réponse aux conditions d'environnement : en l'absence de nutriments, une spore se forme à l'intérieur de la bactérie et est libérée lorsque la bactérie s'autolyse. La spore est une cellule bactérienne au repos, hautement résistante à la dessication, à la chaleur et aux agents chimiques. Replacée dans des conditions nutritionnelles favorables, la spore germe et redonne une bactérie identique à celle qui lui a donné naissance. La spore est donc une forme de résistance aux conditions défavorables de vie, avec conservation de toutes les aptitudes génétiquement déterminées.

1.2.2.3. Les champignons

Les moisissures et levures sont des champignons microscopiques. Ce sont des microorganismes eucaryotes. Les moisissures ont des thalles filamenteux (figure 18). Leurs cellules s'allongent pour former des filaments d'environ 2 à 12 µm de diamètre, coenocytiques (non cloisonnés) ou septés (cloisonnés). L'enchevêtrement des filaments donne naissance à un mycélium visible à l'œil nu sur les milieux de culture qui correspond à une colonie fongique. Ils se développent par croissance polarisée, c'est-à-dire par allongement des axes de ramification. Ils ont une multiplication asexuée avec des milliards de conidiospores véhiculées par l'air. Ils peuvent être pathogènes pour l'homme et producteurs de toxines appelées mycotoxines.

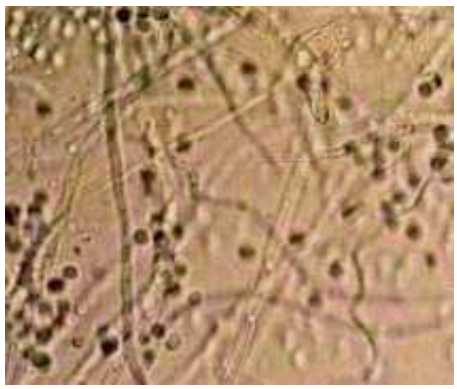


Figure 18 : Aspect des moisissures (thalles filamenteux) [11]

Les levures ont des thalles levuriformes (figure 19). Ils se développent avec une croissance dépolarisée et se reproduisent par voie sexuée en se multipliant végétativement, générant de nombreuses spores de dissémination (ascospores thermorésistantes). Ils peuvent être pathogènes pour l'homme mais ne produisent pas de mycotoxines.

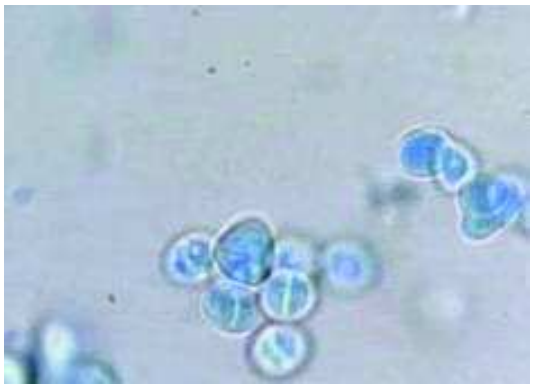


Figure 19 : Aspect des levures (thalle levuriforme) [11]

Les champignons sont généralement hétérotrophes, saprophytes, et capables de se propager dans différents environnements grâce à leurs aptitudes métaboliques étendues. Les champignons sont ubiquitaires, et retrouvés dans l'air, l'eau, les sols, sur les plantes vivantes ou en décomposition, dans les matières premières, etc... Ils peuvent être responsables de défauts dans la production des préparations injectables, par leur croissance, leur métabolisme ou leur pouvoir infectieux. Ils provoquent souvent des altérations d'aspect, de produits, ou d'environnement. Ils peuvent, selon les espèces et les souches voire l'environnement, générer des métabolites toxiques (mycotoxines) et des composés organiques volatiles (COV) à l'origine de réactions allergiques et d'infections superficielles ou profondes chez l'homme. Le nombre théorique des différentes espèces de champignons sur la terre a été estimé à 1 500 000 [17] et environ 70 000 espèces seraient décrites, parmi lesquelles plusieurs milliers de « moisissures ». Les genres les plus fréquemment retrouvés dans les industries pharmaceutiques sont Aspergillus, Cladosporium et Penicillium. La gestion des flux d'air a une importance capitale pour la maîtrise de leur contamination.

1.2.2.4. Les virus

Un virus est un agent infectieux de petites tailles (20 à 300nm) nécessitant un hôte, souvent une cellule, dont il utilise le métabolisme et ses constituants pour se répliquer. Le virus est capable de s'exprimer par l'intermédiaire de sa cellule hôte. On distingue deux types de virus selon leur structure : les virus nus et les virus enveloppés (figure 20). Les virus nus sont constitués de deux éléments principaux. Le premier est le génome viral à ADN ou à ARN constituant le patrimoine génétique du virus. Le second est la capside, composée de protéines polymérisées permettant la protection du virus. Sa conformation permet de distinguer les virus icosaédriques des héloicoïdales. Les virus enveloppés sont eux constitués des deux précédents éléments ainsi que d'une enveloppe externe. Cette dernière dérive de la bicouche lipidique des cellules infectées et est générée lors du bourgeonnement des virions. Cette structure rend le virus plus fragile que les virus nus.

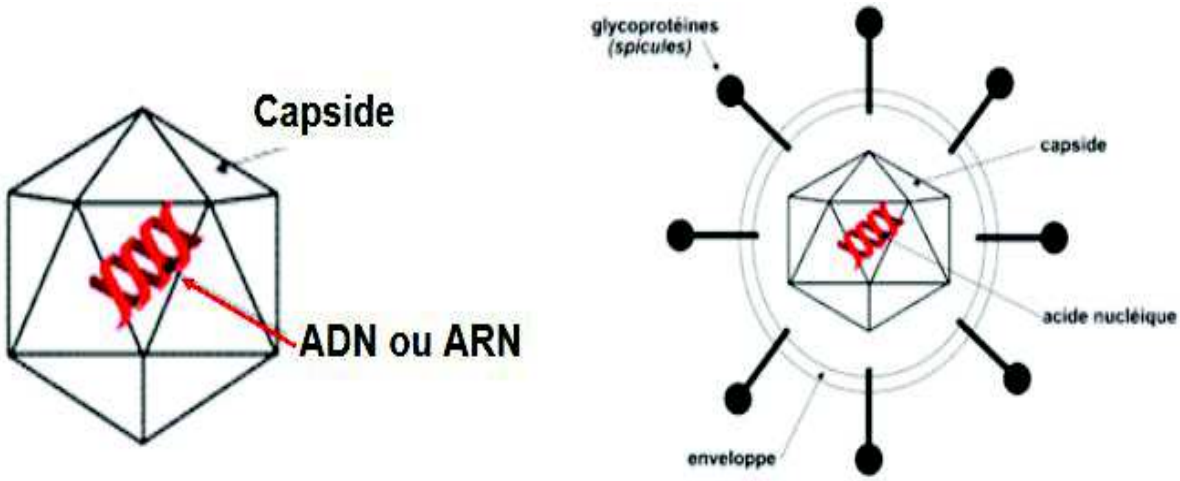


Figure 20 : Structures des virus nus à gauche et enveloppés à droite

Les virus ne peuvent se répliquer qu'au sein de cellules vivantes. C'est l'interaction du génome viral et de la cellule hôte qui aboutit à la production de nouvelles particules.

En conclusion pour la contamination microbiologique, près des ¾ des germes trouvés en ZAC sont d'origine humaine. Parmi les germes les plus souvent rencontrés en production, on compte :

- **Les Cocci à Gram positif dont *Micrococcus luteus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus hominis, Staphylococcus capitis* et *Staphylococcus warneri***
- **Les bacilles à Gram positif dont *Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens* qui sont des bactéries sporulantes et *Corynebacterium tuberculostearicum***

Parmi les germes retrouvés en ZAC, on peut également trouver des germes pathogènes bactériens dont *Bacillus cereus* et germes pathogènes appartenant aux champignons tels que *Aspergillus fumigatus* et *Scopulariopsis brevicaulis.* En moindre nombre on retrouvera également des bacilles à Gram négatif, des moisissures, des levures et des coques à Gram négatif. La multiplication des microorganismes va dépendre de la température, de l'humidité, du pH et de la présence de nutriments. Tous ces microorganismes ont un bon développement dans des conditions naturelles. L'Homme et les climatisations étant de plus des vecteurs de dissémination, le monitoring environnemental en ZAC est essentiel.

1.2.3. Contamination chimique

Un contaminant chimique est une espèce chimique individuelle (ion, atome ou molécule) ou un ensemble d'espèces chimiques (film, goutte ou particule) pouvant avoir un effet indésirable sur le produit ou le patient. Suivant les cas, ces espèces chimiques sont classées en différentes catégories suivant leurs effets : organiques condensables, acides, bases, dopants, corrosifs, etc. La contamination chimique est ainsi une contamination par des éléments sous forme gazeuse, liquide ou solide, durant la chaîne de production. La majeure partie des contaminations chimiques correspondent à des contaminations croisées dues entre autres à un mauvais rinçage lors des opérations de nettoyage.

Quel que soit son type, la contamination d'un médicament peut avoir plusieurs niveaux. La contamination peut tout d'abord modifier les caractères organoleptiques (changement de couleur) et physico-chimiques (modification de l'efficacité) du médicament. La contamination peut également entraîner des risques de septicémie, d'embolie (particules dans un injectable), de troubles digestifs et cutanés. Cette contamination peut également avoir un coût et donner une mauvaise image de l'entreprise avec la destruction ou le rappel d'un lot.

1.3. Sources et vecteurs de contamination

Les contaminants ont plusieurs origines. Ils peuvent être présents dans l'air extérieur ou générés par le travail en ZAC par le procédé de fabrication ou simplement généré par l'Homme.

1.3.1. Les contaminants provenant de l'environnement

Les particules que nous respirons dans l'air ambiant extérieur ont plusieurs origines ;

- Certaines sont d'origines naturelles ou environnementales :
    - Minéraux : Sels marins, phénomènes naturels (éruptions volcaniques, tremblement de terre), sols,
    - Organiques : Végétaux (pollen, spores),
    - Stellaire : Poussière cosmique.
- D'autres proviennent de l'activité industrielle ;
- D'autres de l'activité humaine :
    - Produits de combustions,
    - Gaz d'échappements,
    - Tabac,
    - Poussières d'exploitation.

La quantité de particules présentes dans l'air dépend de l'endroit où l'on se trouve. Le tableau 5 nous montre le nombre de particules présentes par m^3 d'air, de diamètre $\leq 0{,}5\mu m$.

Tableau 5: Nombre de particules par m3 d'air (diamètre ≤ 0,5µm) selon l'environnement [15]

Ambiances extérieures	Ambiances intérieures	Nb de particules par mètre^3 d'air (diamètre ≤ 0,5 µm)
Site industriel lourd		400 000 000
Centre urbain, forte activité		200 000 000
	Bureaux fumeurs	150 000 000
	Ateliers de mécanique	100 000 000
	Bureaux	25 000 000
Petite ville, temps calme		20 000 000
Campagne, temps calme		10 000 000
	Salle propre microélectronique	40 à 4 000

Le nombre de particules par m^3 d'air dépend d'autre part de la saison, des vents, des émissions locales et peut varier beaucoup d'un jour à l'autre. Il est admis que l'air extérieur non traité contient un taux de particules supérieures à 0,1µm de diamètre compris entre 5.10^8 à 1.10^{10} par m^3, soit un niveau inacceptable pour la fabrication de médicaments stériles. Les systèmes de ventilation permettent de s'affranchir de ces contaminants externes par l'utilisation de filtres changés périodiquement.

1.3.2. Les contaminants générés par le travail en ZAC

Plus particulièrement les sources de contaminations à prendre en compte dans le travail en ZAC selon les 5M sont :

- Matières : la production antérieure notamment avec le risque de contamination croisée, les fluides du process, les matières premières. Pour cela un système d'agrément des fournisseurs est demandé,
- Matériel : Les équipements avec l'usure des machines, des matériaux, les mouvements mécaniques des machines, la présence de matériel informatique et de production et les défauts de nettoyage ou de désinfection possible,
- Milieu : L'environnement avec les sols, murs, plafonds, l'air, les fluides, et les insectes,

- Méthodes : avec le système documentaire qui requiert par exemple l'utilisation de dossiers et procédures en ZAC, ou encore la qualification de l'emballage des charges.
- Main d'œuvre : avec le personnel comprenant les opérateurs, les préleveurs, la maintenance.

1.3.2.1. Les contaminations générées par le procédé de fabrication

Les particules métalliques proviennent principalement des frottements, des pièces en mouvement et de l'outillage. Ces particules métalliques peuvent être détectées avec l'utilisation de détecteurs de métaux. Les particules de verre proviennent principalement des articles de conditionnement primaire. Ces particules de verres sont principalement détectables par l'intermédiaire des mireuses. Les contaminants présents en ZAC ne sont cependant pas uniquement apportés par l'air extérieur ou les équipements mais également par l'Homme.

1.3.2.2. Les contaminations apportées par l'Homme

La présence humaine est la principale source de contamination dans une ZAC. La figure 21 permet de se rendre compte de la quantité de particules que l'homme peut émettre en fonction de son activité :

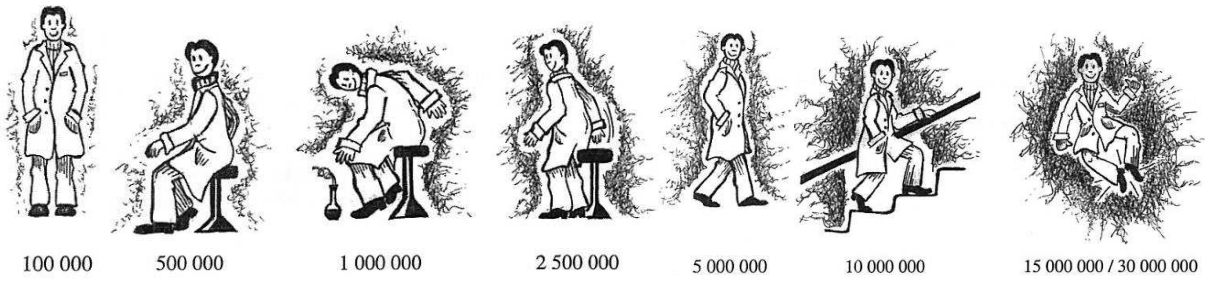


Figure 21 : Nombre de particules émises par une personne habillée d'une tenue standard de salle propre en fonction de son activité pour les particules ≥ 0,3 µm [9]

Cette figure illustre comment le comportement et la gestuelle du personnel peut influer l'émission de particules. Il est donc possible de réduire significativement la génération de particules avec une gestuelle adaptée au travail en ZAC et en réduisant le nombre de personnes travaillant dans une salle propre.

L'Homme possède une flore microbienne commensale importante. Il a été calculé que chez l'humain 10^{12} bactéries colonisent la peau, 10^{10} bactéries colonisent la bouche et 10^{14} habitent dans l'intestin. D'autre part, l'organisme humain présente dix fois plus de bactéries au niveau des espaces extérieurs (peau, poumons, tubes digestifs) que de cellules qui le constituent. La figure 22 permet de se rendre compte de l'importance de cette flore microbienne chez l'homme.[18]

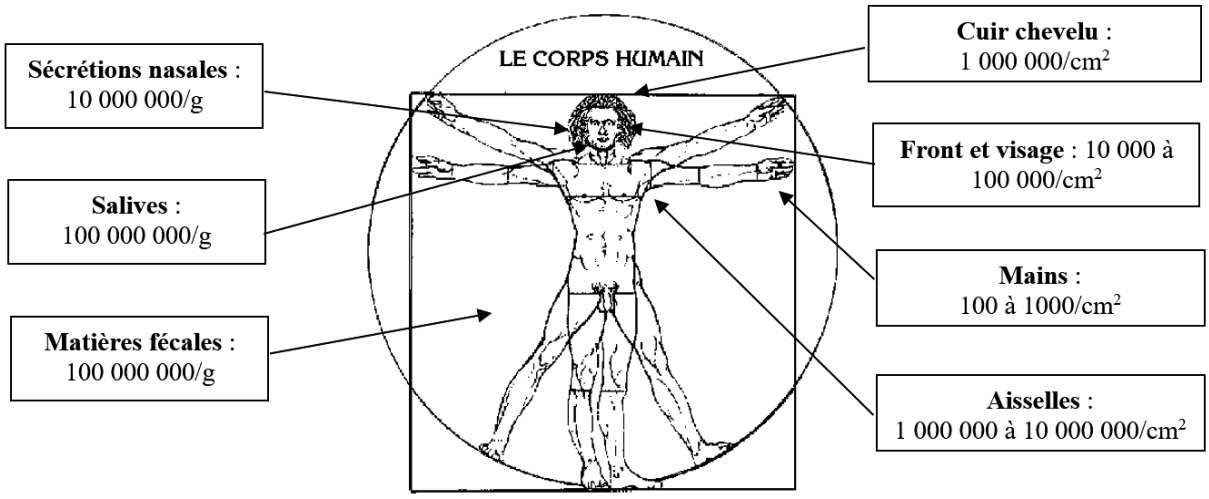


Figure 22 : Flore microbienne de l'Homme

Parmi les plus importants générateurs de microorganismes on recense les cheveux et la peau. Une propreté et une hygiène personnelle de haut niveau sont donc essentielles. La main étant notre premier outil de travail, elle doit rester propre, gantée ou non. Les mains, très exposées, contiennent jusqu'à 10^8 organismes par cm^2 de peau. Ces organismes peuvent avoir différentes provenances comme l'extérieur ou d'autres zones du corps. Le lavage des mains est donc indispensable afin d'éviter les contaminations. D'autres refuges à bactéries, générateurs de contamination sont à abolir. Il s'agit du maquillage, des bracelets, bagues, boucles d'oreilles, lunette, montre mais aussi crayons, nourriture, journaux, chewing-gum, calculettes et téléphones portables.

Il existe deux types de contaminants microbiens provenant de l'homme : la flore résidante et la flore pathogène. La flore résidante est permanente. Elle se reproduit sur la peau et est peu transférable. Elle est généralement bénéfique et non pathogène. La flore transportée peut être

pathogène. Elle doit être éliminée par la mise en place de mesures d'hygiène mais est très facilement transférable. Pour cette raison, il est demandé aux personnes travaillant en ZAC d'avertir un responsable pour toutes affections afin d'évaluer le risque de dissémination de contaminants. Le responsable évalue l'impact potentiel de l'affection en fonction de l'activité à réaliser et autorise ou non l'entrée en ZAC.

Un des problèmes dont il faut également tenir compte est celui de la contamination croisée[19]. L'air, le personnel, le produit et les surfaces pouvant être tour à tour sources et vecteurs de contamination, l'attitude du personnel devra être très stricte afin de minimiser l'effet d'interférence. La figure 23 nous montre comment les sources ou vecteurs de contamination interfèrent entre eux.

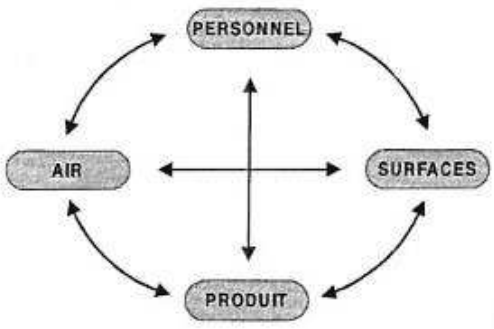


Figure 23 : Interférence des sources et vecteurs de la contamination

L'électricité statique est un élément à prendre en compte car elle est un vecteur favorisant le transfert des contaminations entre l'air et les surfaces.

Une propreté personnelle, des mesures d'hygiène de haut niveau ainsi qu'un comportement et une gestuelle adaptés sont donc requises pour le travail en ZAC.

Pour réduire le risque de contamination par des microorganismes, il est nécessaire de lutter contre tous les types de contaminants. Car ces derniers, qu'ils soient particulaires ou microbiens, résidants ou transportés sont émis en permanence. Afin d'assurer que la production soit réalisée dans des bonnes conditions, un monitoring environnemental des ZAC est réalisé.

2. Monitoring environnemental associé au travail en ZAC

La Ligne Directrice n°1 des BPF concerne la fabrication des médicaments stériles. Selon sa définition une ZAC est une zone dont le contrôle de la contamination particulaire et microbienne dans l'environnement est défini et qui est construite et utilisée de façon à réduire l'introduction, la multiplication ou la persistance de substances contaminantes.

2.1. Monitoring des paramètres non viables

Les paramètres non viables suivis en ZAC sont :

- La pression absolue,
- La pression différentielle,
- La température,
- L'hygrométrie,
- Le comptage particulaire.

Ces paramètres sont suivis pendant et en dehors de la production. Concernant les différentiels de pression il est demandé pour les classes de propreté B, C et D que le différentiel de pression soit de ± 15 Pa minimum par rapport au local contigu de classes différentes et de ± 5 Pa minimum par rapport au local contigu de même classe. Il n'y a pas d'exigence pour la classe A autre que le maintien de la laminarité des flux. La température des ZAC doit elle se situer à 20 ± 3°C. Enfin l'humidité relative doit être comprise entre 30 et 60%. Concernant le comptage des particules les normes ont déjà été mentionnées dans la partie I « Production aseptique des préparations injectables », tableau 2. Des seuils d'alarmes (d'alerte et d'action) doivent être définis et tout dépassement doit être commenté. Le monitoring est réalisé via :

- Des appareils de mesures (capteurs de pression, sondes de température et d'humidité, compteurs de particules),
- Un système d'acquisition de données en temps réel,
- Un système de traitement de données.

Il permet d'afficher en temps réel des valeurs analogiques des différents capteurs de l'installation, d'enregistrer et d'archiver les paramètres physiques environnementaux des locaux classés. Il permet également de générer et de gérer des alarmes liées à ces paramètres.

Plus précisément le comptage particulaire correspond à un photomètre capable de déterminer avec précision la taille en diamètre optique équivalent (figure 24), ainsi que le nombre de particules dans un volume d'air déterminé (généralement 1pied-cube, soit 28,32 litres). Ces compteurs de particules peuvent être fixes ou mobiles.

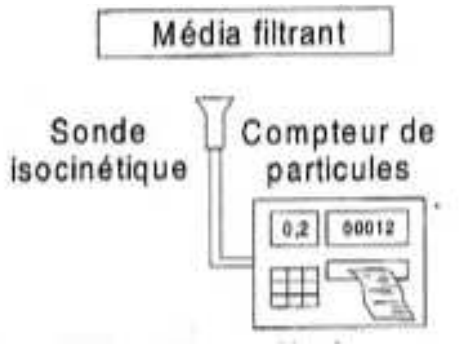


Figure 24 : Composants d'un compteur particulaire [9]

2.2. Monitoring des paramètres viables

Comme vu dans la partie I « Production aseptique des préparations injectables » et représentées dans le tableau 3, les classes de propreté des ZAC sont également définies par des limites de contamination microbiologique. La production aseptique doit s'effectuer dans des locaux respectant au moins la classe d'empoussièrement B, avec zones de flux laminaire au-dessus des surfaces où le produit est exposé à l'air. Les zones de flux laminaire respectent la classe A. La surveillance microbiologique est demandée par les BPF et concerne la recherche de microorganismes sur les surfaces (biocontamination de surface) et dans l'air (aérobiocontamination). Ces contrôles se font pendant les étapes de production et ne doivent pas interférer avec la protection des zones. De plus, une surveillance supplémentaire doit être réalisée en dehors des phases de production comme par exemple après des opérations de validation, de nettoyage ou de désinfection.

2.2.1. Les dispositifs de contact

Selon la norme IOS 14 698 [20], un dispositif de contact est un appareil spécifique renfermant un milieu de culture approprié, stérile, dont une surface est accessible pour échantillonnage. Parmi les dispositifs de contact utilisés pour la réalisation du contrôle microbiologique d'environnement, on compte :

- La boîte contact (CT) : dispositif de contact dont le réceptacle est constitué d'une boîte de Pétri (BP),
- L'échantillonneur par impaction / par piègeage : dispositif destiné à prélever des particules dans l'air ou dans d'autres gaz par impact avec une surface solide / liquide,
- L'écouvillon : dispositif de prélèvement stérile, non toxique et ne gênant pas la croissance des microorganismes à prélever, constitué d'une matrice spécifique de taille adaptée, monté sur un applicateur. L'écouvillonnage peut être utilisé pour le prélèvement des surfaces non planes.

2.2.2. Typologie des contrôles

Afin de déterminer et suivre l'état de contamination microbiologique de l'environnement des salles et du personnel, différents types de contrôle sont réalisés.

2.2.2.1. Contrôle volumétrique

Le principe des contrôles volumétriques, réalisés à l'aide d'aérobiocollecteur, est de récolter des microorganismes dans l'air. Pour ce contrôle, $1m^3$ d'air est aspiré avec un débit suffisant pour éviter des temps d'échantillonnage longs qui dessèchent les milieux de culture. La vitesse d'aspiration doit être suffisante pour piéger des particules de diamètre supérieur à 1µm sans toutefois altérer leur viabilité ou les désagréger. Pour cela un débit de 100L/min semble convenir. Différents types de biocollecteurs existent :

- Les biocollecteurs à crible pour lesquels le principe d'impaction peut être utilisé avec plusieurs étages de cribles. La capture des UFC (Unités Formant Colonies) dépend alors de leur taille et de la vitesse de l'air impactant la gélose,
- La collecte peut également se réaliser par impaction sur une boîte de Pétri,
- Impacteur à hélice où la rotation de l'hélice projette les UFC vers des cellules de gélose placées autour.

2.2.2.2. Contrôle statique

Le contrôle statique repose sur le principe de sédimentation des particules. Cette mesure n'indique que les taux de transfert air/surface et met surtout en évidence les particules lourdes. Pour les contrôles statiques une BP est ouverte et placée à l'un des endroits définis par l'analyse de risque. Aucun texte ne précisant comment déterminer le plan d'échantillonnage des UFC dans l'air, il est possible de s'appuyer sur le plan d'échantillonnage établi pour les contrôles particulaires. C'est la position de l'appareil qui détermine l'efficacité de la collecte. Les zones à vitesse d'air excessives sont à éviter et les points les plus proches des zones sensibles sont choisis.

2.2.2.3. Contrôle de surface

Les contrôles de surface correspondent à des prélèvements par contact de la CT, BP ou écouvillon sur une surface. Pour ces contrôles il est important de standardiser le temps et la pression de contact. Le prélèvement se fait sur une zone d'environ 20 cm autour des points de contrôle identifiés. Après le prélèvement, les traces de milieu de culture doivent être éliminées de la surface contrôlée. Les outils utilisés sont également prélevés sur les deux faces par CT / BP /écouvillon puis désinfectés.

Pour les contrôles de surface par écouvillonnage, il faut limiter par un pochoir la surface à contrôler. Il ne faut pas utiliser d'écouvillon sec. Lors du prélèvement, le préleveur réalise un balayage régulier de la surface en croisant les mouvements. D'autre part, le fait d'augmenter la

pression ou le temps de prélèvement n'améliore pas le rendement. Concernant le plan d'échantillonnage des prélèvements de surfaces, aucun texte ne précise la méthode. Un nombre de points dans chaque salle est donc à déterminer et les prélèvements se font chaque fois aux points critiques et à quelques points pris au hasard dans la liste établie. Pour la détermination des points et de la fréquence, il est possible de s'appuyer sur une analyse de risque.

Pour le contrôle microbiologique des surfaces, il est également possible d'utiliser la méthode de l'ATP Métrie. L'ATP (Adénosine TriPhosphate) est un nucléotide qui permet de fournir l'énergie nécessaire aux réactions chimiques chez les microorganismes. Cette technique est basée sur le principe de la bioluminiscence. La valeur de luminosité obtenue permet grâce à un étalon d'estimer la quantité d'ATP et donc une prise de connaissance rapide de l'état des surfaces. Cependant elle n'indique pas le nombre de microorganismes et prend en compte les microorganismes morts et vivants ainsi que les traces organiques.

2.2.2.4. Contrôle des empreintes de gants

Un contrôle des empreintes des gants est réalisé après chaque intervention critique ou nécessitant une ouverture de carter et sortie de ZAC. Ce contrôle est réalisé sur une boîte de Pétri (BP), à raison d'une BP par main. Pour le contrôle chaque phalange est roulée sur la gélose en commençant par l'index pour finir par le pouce. L'impression des doigts doit être visible sur la gélose. La seconde main est prélevée sur une autre BP selon la même technique. Il est formellement interdit d'avoir les gants humides de désinfectant au moment du prélèvement. Immédiatement après le prélèvement, les gants doivent être nettoyés à l'aide d'une lingette non tissée à usage unique, imbibée du désinfectant adéquat ou changés.

2.2.2.5. Contrôle des tenues

Un contrôle des tenues est réalisé à chaque sortie définitive de ZAC. Les points prélevés sont l'avant-bras droit, l'avant-bras gauche, le torse (droit ou gauche) et la cagoule.

2.2.3. Contrôles supplémentaires

Des prélèvements supplémentaires en classe A et B sont réalisés en division dans les cas suivants :

- Les prélèvements des gants de la boîte à gants des intro-nests,
- La recherche de levures et moisissures en cas d'investigation,
- Le prélèvement de corps étranger,
- Les prélèvements après intervention critique,
- Les prélèvements avant toute sortie de bloc,
- Les prélèvements pendant la filtration stérilisante.

Tous ces prélèvements sont ensuite envoyés pour incubation et lecture au Laboratoire de Biologie (LB). Le LB a pour responsabilité l'identification des microorganismes. Selon le microorganisme et sa sensibilité ou résistance aux désinfectants de routine ou s'il s'agit d'une bactérie sporulante, des actions spécifiques adaptées seront déployées.

2.2.4. Les milieux de culture

Un milieu de culture est un support qui permet la culture de cellules, de bactéries, de levures et de moisissures. Différents milieux de culture sont utilisés pour les contrôles microbiologiques d'environnement. Les plus courants utilisés en industrie pharmaceutique pour le contrôle microbiologique de l'environnement sont :

- Le milieu Trypticase Soja (TS) est un milieu d'utilisation générale pour la recherche des bactéries aérobie et anaérobie facultatives (ayant besoin d'oxygène pour se développer),
- Le milieu Sabouraud est utilisé pour la recherche spécifique des moisissures et levures.

Les milieux de culture sont le plus souvent utilisé sous forme de gélose, c'est-à-dire solidifié avec de l'Agar-Agar mais ils sont également utilisables sous forme de bouillon, en particulier pour les prélèvements par écouvillonnage.

2.3. L'analyse des tendances

A partir du monitoring des particules viables, des tendances environnementales et des analyses de la répartition des germes peuvent être réalisées. On peut entres autres obtenir les données suivantes :

- Le nombre d'espèces différentes identifiées dans la flore de l'environnement d'une zone
- Le taux de non-conformité par ZAC,
- Le pourcentage d'occurrence d'un genre en particulier,
- Le pourcentage des germes humains,
- Le pourcentage des germes pathogènes,
- Le pourcentage de germes aérobies/ anaérobies,
- La répartition de la flore totale par groupe de germe en fonction de l'occurrence.

La figure 25 représente un exemple de répartition de la flore totale par groupe de germes pouvant être trouvée en ZAC.

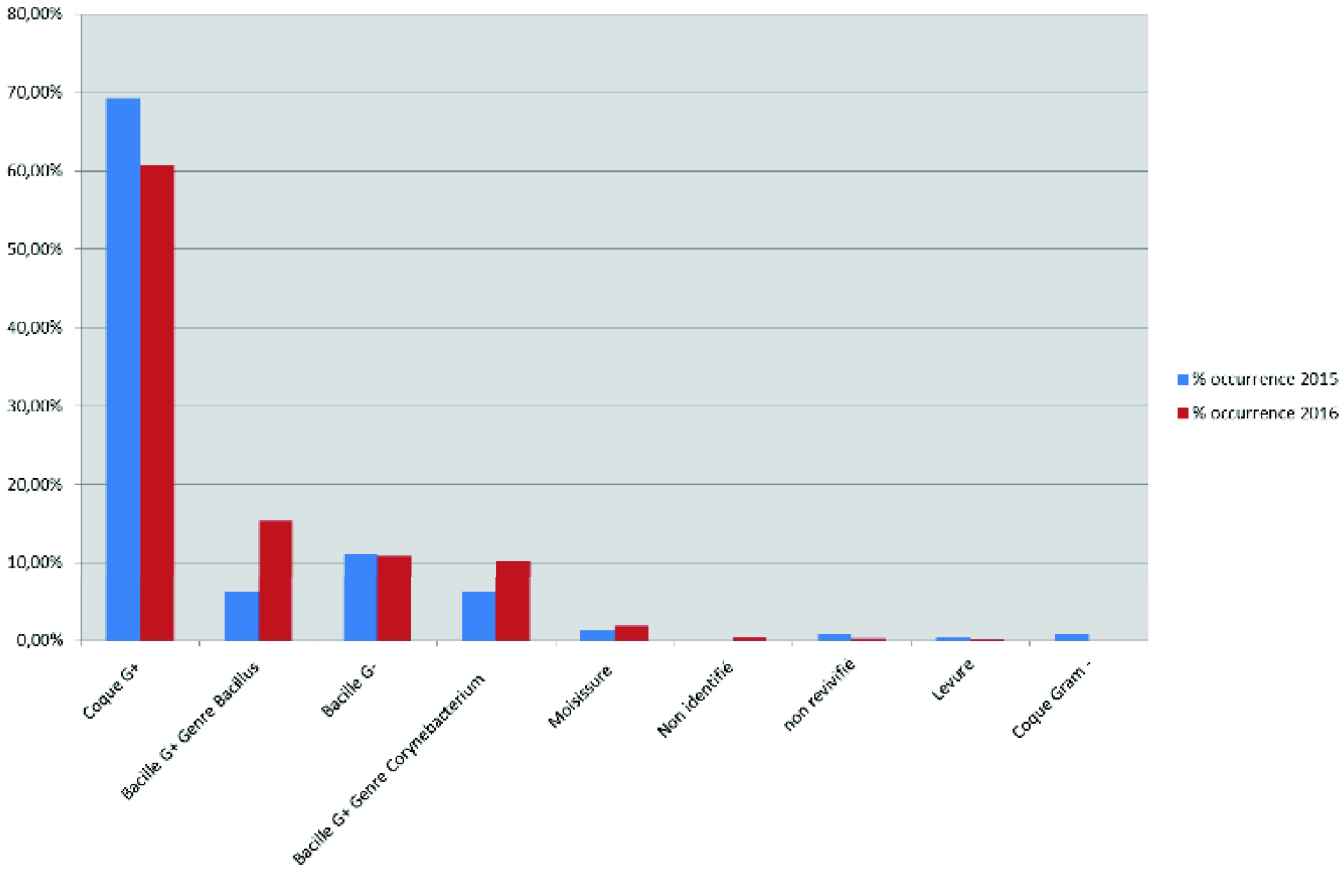


Figure 25 : Evolution de la répartition des groupes de germes entre 2015 et 2016 [11]

Selon ces tendances, il est possible de déterminer les évolutions du nombre de contaminations, de les comparer sur des périodes données et de savoir si elles sont significatives ou non. Selon la répartition des germes, il est possible de déterminer si les désinfectants utilisés sont appropriés ou non. Selon le taux de contamination obtenus, l'efficacité d'une méthode mise en place pour limiter et éliminer les microorganismes, comme par exemple une adaptation du flux de stockage, peut être confirmée ou infirmée. Selon l'ensemble de ces données une stratégie de réduction de contamination peut être déployée. Par exemple si on remarque la récurrence d'un germe *Bacillus* qui est un bacille à Gram positif sporulant, une utilisation de sporicide à chaque détection d'un germe est requise pour lutter efficacement contre sa dissémination. L'analyse de la répartition des germes permettra enfin de déterminer les souches additionnelles testées pour les validations de méthode stérilité et dénombrement microbien.

3. Moyens de maîtrise

3.1. Normes et textes de référence pour la maîtrise de la contamination

La commercialisation des injectables sur les marchés mondiaux implique la connaissance approfondie de ces marchés au niveau réglementaire. Ceci implique donc une veille constante des réglementations afin d'intégrer les nouvelles techniques de production et des formations permanentes du personnel, en adéquation avec l'évolution du référentiel qualité sur le plan mondial. La maîtrise de ce référentiel qualité permet en contrepartie de choisir les méthodes de fabrication afin de répondre à l'attente du client.

Jusqu'en novembre 2001, le référentiel pour les classes d'empoussièrements est la norme américaine *Federal Standard 209E* [21] (tableau 6). Cette recommandation détermine des classes de propreté des particules en suspension dans l'air, dans les salles blanches et les zones propres. Ce référentiel était exprimé en nombre de particules par pied cube, qui correspond à 28,4L.

Tableau 6 : Norme *Federal Standard 209E* (Norme américaine) en particules/pied cube

Nombre de particules Par pied cube (28,4 litres)			
U.S.	0,2µm	0,5µm	5µm
100	750	100	
10 000		10 000	70
100 K		100 K	700

Le tableau 7 donne ses équivalences en particules/ m^3.

Tableau 7: Norme *Federal Standard 209E* (Norme américaine) en particules/m^3 d'air

Numéro de classification	Concentrations maximales admissibles (particules/m³ d'air) en particules de taille égale ou supérieure à celle donnée ci-dessous				
	0,1 µm	0,2µm	0,3µm	0,5µm	5µm
Classe 1	1240	265	106	35,3	-
Classe 10	12 400	2 650	1 060	353	-
Classe 100	124 000	26 500	10 600	3 530	-
Classe 1 000	-	-	-	35 300	247
Classe 10 000	-	-	-	353 000	2 470
Classe 100 000	-	-	-	3 530 000	24 700

Le référentiel actuel est la norme ISO 14644-1 [22] (tableau 8). Cette recommandation donne la méthodologie de classification de salles propres et environnements maîtrisés apparenté. Elle caractérise la qualité d'une enceinte par la concentration maximale en nombre de particules par m^3 d'air, pour chaque taille particulaire se situant dans une étendue granulométrique de 0,1 à 5 µm.

Tableau 8 : Norme ISO 14644-1

Numéro de classification ISO (*N*)	Concentrations maximales admissibles (particules/m³ d'air) en particules de taille égale ou supérieure à celle donnée ci-dessous					
	0,1 µm	0,2µm	0,3µm	0,5µm	1µm	5µm
Classe ISO 1	10	2				
Classe ISO 2	100	24	10	4		
Classe ISO 3	1 000	237	102	35	8	
Classe ISO 4	10 000	2 370	1 020	352	83	
Classe ISO 5	100 000	23 700	10 200	3 520	832	~~29~~
Classe ISO 6	1 000 000	237 000	102 000	35 200	8 320	293
Classe ISO 7				352 000	83 200	2 930
Classe ISO 8				3 520 000	832 000	29 300
Classe ISO 9				35 200 000	8 320 000	293 000

Concernant le tableau 8, la valeur barrée « ~~X~~ » n'est plus valable depuis février 2016 suite à une montée de version.

Remarque : Les classes en couleur reflètent la similitude entre l'ancien référentiel (FD S 209 E représenté dans le tableau 6) et le nouveau (ISO 14644 – 1 représenté dans le tableau 7).

Enfin les BPF européennes définissent les classes particulaires selon le tableau 9.

Tableau 9 : Classes particulaire selon Annexe 1 BPF [8]

Classe	Au repos		En activité	
	Nombre maximum de particules par m3 d'air			
	0,5µm	5µm	0,5µm	5µm
A	3 520	20	3 520	20
B	3 520	29	352 K	2 900
C	352 K	2 900	3 520 K	29 000
D	3 520 K	29 000	nd	nd

Classe	Air UFC / m3	Sédimentation UFC / 4 heures	Surfaces UFC Ø55mm	UFC / gant
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	
D	200	100	50	

En résumé, il existe de nombreuses classifications, dont les équivalences sont représentées dans le tableau 10 :

Tableau 10 : Equivalence de classes [11]

US Std 209 E	BPF Europ. Au repos	BPF Europ En activité	ISO 14 644-1
10			Iso 4
100	A and B	A	Iso 5
1 000			Iso 6
10 000	C	B	Iso 7
100 000	D	C	Iso 8
			Iso 9

Concernant la biocontamination, la norme ISO 14698 est le référentiel pour les méthodes de maîtrise du risque de Biocontamination en salle blanche.

3.2. Principes généraux de la maîtrise de la contamination

Les principes de base pour la maîtrise de la contamination sont :

- La mise en place de flux matières et de personnes,
- La mise d'un local en surpression,
- La filtration et le renouvellement de l'air de la ZAC.

En plus de ces mesures, il faut limiter l'émission de particules et nettoyer et désinfecter les locaux.

3.2.1. Flux des matières et des personnes

Selon les BPF chapitre 3, l'agencement, la conception et l'utilisation des locaux et matériels doivent tendre à minimiser les risques d'erreurs et à permettre un nettoyage et un entretien efficace en vue d'éviter les contaminations, le dépôt de poussières ou de saletés et, de façon générale, toute atteinte à la qualité des produits. [23] Des mesures techniques ou une organisation appropriée doivent ainsi pouvoir limiter la contamination croisée, comme par exemple la production dans des zones séparées, l'installation de sas et de système d'extraction d'air, l'utilisation de « système clos » de fabrication. Pour cela une délimitation précise et un dimensionnement adapté des ZAC doivent être réalisés. Ceci concerne les locaux suivants : zone de réception des matières premières, zones de stockage, zone de production (fabrication et conditionnement), laverie, sas, local technique avec le principe de « marche en avant » où un produit ou une personne n'a pas besoin de revenir en arrière pour la suite de la production.

L'entrée dans les zones se fait par des sas réservés au personnel et/ou au matériel et aux substances. La taille des ZAC doit être réduite au minimum avec un niveau de sécurité élevé. Il doit y avoir une adéquation zone/avancement process/spécification produit. Enfin, il faut trouver une cohérence des flux entrants (Matières, Matériel, Personnel) vers la zone et des flux sortants de l'intérieur vers l'extérieur pour contrer ces risques.

3.2.2. Gradient de pression

La mise en surpression d'un local permet d'éviter l'entrée de contaminants extérieurs. La surpression ou dépression de la zone, comme schématisé sur la figure 265, est de :

- Au moins 20 Pa entre l'extérieur et la 1ère zone classée,
- Au moins 15 Pa entre les zones classées différentes adjacentes,
- Au moins 5 PA entre deux zones classées identiques adjacentes.

Elle est obtenue par un apport continu d'air neuf dans un local étanche. Cette surpression est maintenue par l'utilisation de sas d'accès.

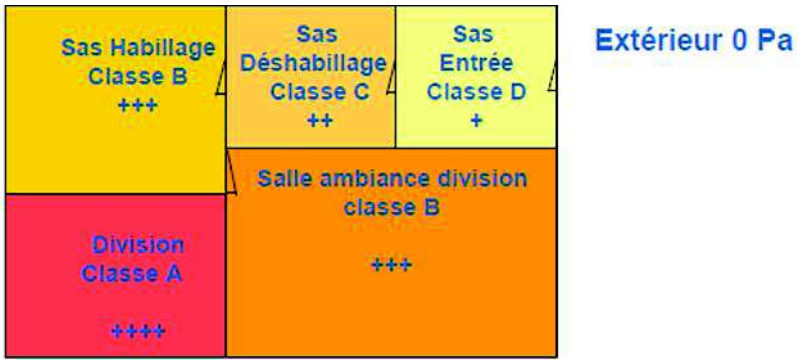


Figure 26 : Principe de surpression [11]

Le choix de mettre un local de production en surpression ou en dépression va dépendre du produit. Si la zone est en surpression (débit de soufflage d'air > débit d'extraction et de fuite d'air) le produit sera protégé des contaminants extérieurs alors que si la zone est en dépression (débit de soufflage d'air < débit d'extraction et de fuite d'air) c'est le personnel qui sera protégé. La dépression de la zone permettra d'éviter la dispersion de poudres et les contaminations croisées.

On appelle les locaux dont le flux va de l'intérieur vers l'extérieur, en raison d'une surpression par rapport aux salles adjacentes, des locaux classés. A l'inverse, on appelle les locaux dont le flux va de l'extérieur vers l'intérieur, en raison d'une dépression par rapport aux salles adjacentes, des locaux confinés (figure 27). Enfin il existe également des locaux/flux à la fois classés et confinés qui permettent par exemple d'empêcher l'entrée de contaminants dans des sas.

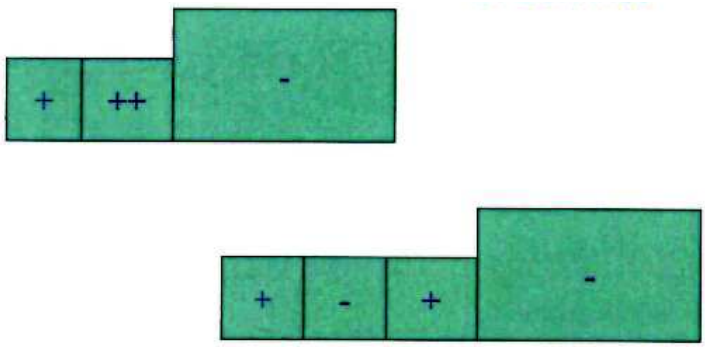


Figure 27 : Exemple de locaux / flux à la fois classés et confinés [11]

3.2.3. La filtration et le renouvellement de l'air

L'air en ZAC, qu'il provienne de l'extérieur ou d'un renouvellement d'air, est préfiltré avec différents niveaux de filtres HEPA pour éliminer les particules.

Les niveaux de filtres HEPA sont listés dans le tableau 11 suivant :

Tableau 11: Classification des filtres HEPA

Numéro du filtre	Le filtre HEPA laisse passer au maximum :
H14	0,005% de particules de 0,3µm/litre d'air
H13	0,05% de particules de 0,3µm/litre d'air
H12	0,5% de particules de 0,3µm/litre d'air
H11	5% de particules de 0,3µm/litre d'air
H10	15% de particules de 0,3µm/litre d'air

La qualité de l'air est assurée en salle par un flux turbulent alors que pour des postes spécifiques, elle sera assurée par un flux laminaire (unidirectionnel). Dans un flux d'air turbulent, l'air brassé homogénéise la température mais entraîne aussi les particules. Dans un flux d'air laminaire, les filets d'air sont rectilignes, c'est-à-dire parallèles, allant dans la même direction, de même sens et de même vitesse (0,45 $m.s^{-1}$).

L'activité dégradant la qualité de l'air, un renouvellement d'air permet l'élimination d'une partie des particules et microorganismes créés par l'activité. On quantifie ce paramètre par le taux de brassage qui correspond au rapport entre le débit total d'air soufflé et le volume de la salle.

$$A = \frac{Q\ m3/h}{Vol\ m3}$$

L'air est ainsi très propre au sortir des filtres mais les particules suivent les mouvements de l'air, ce qui implique que les bouches de reprise sont les endroits les plus contaminés.

La cinétique d'autodécontamination particulaire est définie par le temps Δt nécessaire soit pour obtenir une décontamination de 90% par rapport au pic de pollution initial ($C=C_0/10$), soit pour un retour à la classe revendiquée. La courbe en figure 28 représente cette cinétique d'autodécontamination et respecte la formule $C=C_0.e^{-At}$.

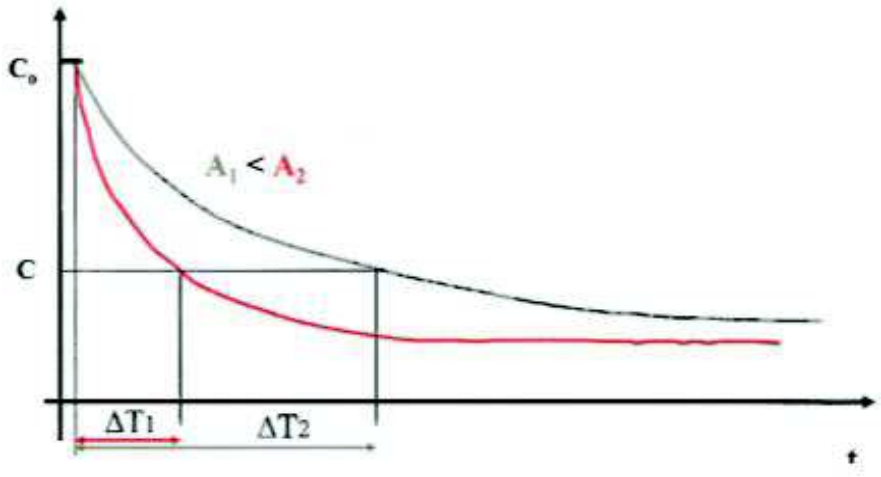


Figure 28: Cinétique d'autodécontamination d'une ZAC [11]

La qualité de l'air au repos va dépendre de la pression relative, du degré de filtration, de l'utilisation des sas et du nettoyage. La qualité de l'air en activité va dépendre de la faculté d'autodécontamination liée au renouvellement de l'air (qui est un paramètre stable) d'une part et de l'émission des contaminants liée au nombre de personnes, à leur tenue et à leur comportement (qui est un paramètre variable) d'autre part. C'est ainsi l'activité qui dégrade la qualité de l'air.

3.2.4. L'habillage

Selon les BPF chapitre 2, toute personne pénétrant dans une zone de fabrication doit porter des vêtements protecteurs appropriés aux opérations qui s'y déroulent. Les vêtements personnels ne doivent pas être introduits dans les vestiaires menant aux locaux de classe B et C. Pour cette raison toute personne de production doit être habillée d'une tenue blanche composée d'un pantalon, d'une casaque, d'une charlotte et de chaussures de sécurité pour se rendre en zone de production.

La tenue de salle propre pour entrer en ZAC est conçue pour limiter l'émission de contaminants. Elle n'est donc utilisée qu'en salle propre et ne doit pas en sortir. Elle est portée fermée et stockée de sorte à éviter le transfert intérieur/extérieur. Le changement de tenue est composé de trois phases, chacune réalisée dans une zone différente :

1. Oter la tenue extérieure,
2. Lavage des mains,
3. Revêtir la tenue de salle propre.

Les montres-bracelets, le maquillage et les bijoux doivent être exclus des ZAC. Sur la figure 29, sont représentées les tenues utilisées en ZAC selon la classe de propreté. A gauche est représentée la blouse pour l'entrée en ZAC classe D. Au milieu est représentée la combinaison pour l'entrée en ZAC classe C. A droite figure la combinaison de type Tyvek® pour l'entrée en ZAC classe A/B.



Figure 29 : L'habillage en ZAC : Classe D, Classe C et Classe A/B [11]

Les combinaisons sont composées de tissus en fibres longues et sont étanches aux particules. La combinaison pour la ZAC classe A/B, possède une continuité entre la cagoule, combinaison, surbottes et gants. Les gants sont revêtus avec une gestuelle permettant de ne pas les contaminer

et sont remplacés régulièrement car ne restent pas propres. Le masque est un écran déflecteur et n'est pas un filtre. Il est lui aussi rapidement contaminé.

Le tableau 12 suivant montre qu'un habillage spécifique est un facteur de réduction d'émission de particules :

Tableau 12 : Nombre de particules de diamètre ≥ 0,3 µm émises / minute par une personne en fonction de l'habillage [24]

Activité	Blouse	Combinaison standard	Combinaison Tyvek®
Aucun mouvement	100 000	10 000	1 000
Léger mouvement (Mouvement d'une partie du corps)	500 000	50 000	5 000
Mouvement ample (Mouvement d'une partie du corps)	1 000 000	100 000	10 000
Changements de position (Mouvement du corps entier)	2 500 000	250 000	25 000
Marche lente	5 000 000	500 000	50 000
Marche rapide	10 000 000	1 000 000	100 000

Ce tableau souligne qu'un individu en blouse de travail (de type laboratoire) avec une activité intense produit 10 000 000 de particules de diamètre supérieur ou égal à 0,3µm par minute alors qu'avec une combinaison de travail adaptée (de type Tyvek®) et la même activité, il ne produit plus que 100 000 particules de diamètre supérieur ou égal à 0,3µm par minute. Il est donc possible de réduire de manière très importante le nombre de particules émises avec une tenue adaptée mais également avec une hygiène et un comportement adaptés.

3.2.5. L'hygiène

Comme vu précédemment, on compte parmi les principaux générateurs de contamination les cheveux et la peau. Une hygiène irréprochable est donc requise. D'autre part la main étant le 1er outil de travail et le 1er vecteur de la contamination il est essentiel qu'elle reste propre, gantée ou non. Il faut donc se laver les mains après chaque geste sale et surtout avant chaque geste propre.

Pour être bien lavée la main doit être nue. Elle ne doit présenter ni blessure, ni maladie de la peau. Les ongles doivent être courts et non vernis. Aucun bijou ne doit être porté. Le lavage des mains diminue le nombre de microbes mais ne les élimine jamais totalement. Les microorganismes restants peuvent donc à nouveau proliférer.

3.2.6. Le comportement

Les règles d'or pour le comportement en ZAC classe A et B sont :

- Se rendre directement à son poste de travail sans détour inutile,
- Ne faire que les gestes strictement nécessaires au travail et le plus lentement possible,
- Marcher sans trop lever les pieds afin d'éviter la remise en suspension des contaminants maintenus au sol,
- Garder les bras immobiles, légèrement écartés du corps, même au repos. De même éviter les positions ou les mouvements de frottement d'une partie du corps sur l'autre (exemples : bras ou jambes croisés) afin d'éviter le phénomène d'attrition qui correspondent à une usure génératrice de particules. Assis poser les mains sur les genoux, paumes dirigées vers le haut,
- Eviter les stations d'appui contre les parois du bloc ou sur les machines afin de minimiser toute contamination,
- Ne jamais se pencher en avant au-dessus du plan de travail de la machine et, d'une façon générale, ne pas créer d'obstacle avec une partie du corps entre le flux laminaire et le produit et/ou les articles de conditionnement,
- Eviter de parler, de tousser pour limiter l'émission de particules et de bactérie,
- Se désinfecter très fréquemment les gants, surtout après avoir touché des objets utilisés par d'autres personnes (poignées de porte, dossier),

- Changer de gants après une longue période d'utilisation, ou après des réglages ou des manipulations dans des zones difficilement accessibles lors des nettoyages et des désinfections,
- Ne jamais ramasser un objet tombé à terre (en cas de force majeure, changer de gants après l'opération),
- Stériliser tout le matériel entrant dans le bloc,
- Stocker le petit matériel dans des endroits ouverts et accessibles aux désinfections aériennes,
- Limiter au maximum le nombre de documents à remplir (préalablement autoclavés),
- N'utiliser que des stylos à billes non rétractables afin d'éviter notamment toute contamination croisée.

Selon les BPF chapitre 2[25], le fabricant doit disposer d'un personnel qualifié et en nombre suffisant pour mener à bien toutes les tâches qui lui incombent. Tous les membres du personnel doivent être conscients des principes de BPF qui les concernent ; il convient d'assurer leur formation initiale et continue et notamment de donner les instructions d'hygiène en rapport avec la fonction exercée.

En conclusion, on peut affirmer que les ZAC répondent à des critères de conception exigeants mais aussi et surtout à une véritable organisation du travail, un comportement rigoureux et une véritable préparation mentale de l'ensemble des salariés y opérant (tableau 13). La lutte contre la contamination comprend des mesures préventives avec l'établissement de barrières telles que la surpression, la filtration de l'air, les sas, la tenue, la gestuelle et les protections locales. La prévention passe aussi par l'élimination des sources inutiles de contaminants, c'est-à-dire que le matériel et le personnel rentrés en ZAC doivent être réduits au minimum requis par les activités. De plus, tout le matériel doit être conçu de manière à ce qu'il relargue le moins de particules possible et qu'il soit

facilement nettoyable et désinfectable. La lutte contre la contamination comprend également des mesures curatives visant à éliminer la contamination créée par l'activité avec le renouvellement d'air, le nettoyage et la désinfection.

Tableau 13 : Résumé du fonctionnement des ZAC

Objectif	Moyens utilisés
Empêcher l'entrée de particules présentes dans l'air (bactéries)	Filtration air entrant et surpression
Eliminer les particules présentes générées par personnel ou process	Taux de renouvellement horaire de l'air important
Limiter les sources	Matériaux / Vêtements / Equipements
	Hygiène / Propreté microbiologique
	Procédures de Travail
Mettre au dehors tout ce qui n'est pas indispensable	Ordre, Rangement, Propreté
Respecter les Flux	Matières/ vrac / semi-finis
	Personnel
	Matériel : Sale / Propre
	Air et fluide du procédé

3.3. Nettoyage et désinfection

La propreté est la condition d'un produit, d'une surface, d'un appareil, d'un gaz ou d'un fluide possédant un niveau défini de contamination[26]. Elle implique des procédés de nettoyage et d'élimination de souillures. Elle peut souvent être contrôlée de façon visuelle et olfactive. La notion d'ultra-propreté est en rapport avec des espaces clos à l'intérieur desquels le niveau de contamination est parfaitement maîtrisé. Elle implique l'élimination de contaminants non visibles avec un contrôle par prélèvement et analyse. Le but du nettoyage est de décrocher et d'éliminer les contaminants de façon définitive, sans recontaminer et sans altération de la surface traitée. Comme vu précédemment les contaminants peuvent être le produit fabriqué, les

particules, les microorganismes ou encore le produit de nettoyage lui-même. Selon les BPF, les équipements et les ustensiles doivent être nettoyés, stockés, et si nécessaire, décontaminés ou stérilisés afin de prévenir la contamination ou le report d'une matière qui pourrait altérer la qualité de l'intermédiaire ou de la substance active au-delà des spécifications officielles ou établies selon d'autres critères.

Le principe général du nettoyage repose dans cet ordre immuable :

- Elimination des déchets,
- Dépoussiérage,
- Lavage,
- Raclage,
- Rinçage,
- Raclage, essuyage ou séchage,
- Désinfection.

L'essuyage humide ne doit pas être confondu avec le lavage. Le lavage nécessite un tissu adapté et un produit d'imprégnation constitué d'eau et d'un détergent. Il impose un raclage. Le rinçage est réalisé avec de l'eau déminéralisée, purifiée ou stérile selon l'exigence et doit être réalisé avec du matériel propre, changé fréquemment. La désinfection s'effectue sur une surface sèche avec des désinfectants spécifiques par pulvérisation, application manuelle ou via un balai applicateur et nécessite un temps d'action. La désinfection n'est jamais rincée.

Une biocontamination est caractérisée par formation d'un biofilm qui permet l'adhésion des microorganismes à la surface. Ce biofilm contient des microorganismes sous forme de colonies qui vont s'auto-alimenter. Le désinfectant ne détruisant que la couche superficielle, la désinfection de surface ne va alors plus suffire. On ne peut donc désinfecter une surface que si elle a été préalablement nettoyée. Ce nettoyage va permettre l'élimination de 90% des contaminants et les microorganismes restants sont tués par le procédé de désinfection.

Un désinfectant est une substance appliquée sur des objets ou des matériaux inertes afin de détruire les microorganismes. Il n'est pas à confondre avec un antiseptique qui s'applique sur les tissus vivants ou l'antibiotique qui est utilisé à l'intérieur d'un organisme ou encore un conservateur qui va empêcher le développement microbien dans un produit. Les désinfectants selon leur famille vont être adaptés à un ou plusieurs types de surface (sols, murs, équipements et mobiliers, gants). D'autre part ils ne sont pas sélectifs des bactéries mais agissent aussi sur les cellules humaines. Afin d'éliminer les effets toxiques et corrosifs, le port d'équipements de protection individuel (EPI) est demandé lors de l'utilisation de désinfectants. La concentration du désinfectant a son importance car en concentration trop faible, il est inefficace et en surdosage il présente des risques toxiques, particulaires et d'inefficacité.

Avant d'entrer dans une salle à nettoyer, il est important de vérifier le programme et la procédure, le planning d'utilisation des désinfectants (des alternances sont possibles afin de réduire le risque de résistance des microorganismes aux désinfectants utilisés), de rassembler tout le matériel nécessaire, de vérifier les dates de péremption des produits et de décontaminer le matériel entrant dans le sas. Dans les procédures doivent figurer la description complète des méthodes et des matières utilisées. Après le nettoyage/désinfection la propreté des équipements peut être surveillée par des contrôles analytiques et un examen visuel, lorsque cela est réalisable. Une inspection visuelle peut permettre la détection d'une forte contamination concentrée sur de petites surfaces, qui pourrait rester non décelée par un échantillonnage et / ou une analyse

En sortant de la salle nettoyée, éliminer les déchets et consommables, nettoyer le matériel réutilisable, ranger le matériel propre et remplir les documents de suivi.

Lorsque l'équipement est affecté à une production continue ou à une campagne de production de lots successifs du même intermédiaire ou de la même substance active, l'équipement doit être nettoyé à intervalles appropriés pour prévenir l'accumulation et le report de contaminants (par exemple, des produits de dégradation ou un niveau indésirable de microorganismes). Les

équipements non dédiés doivent être nettoyés entre la production de deux produits différents afin de prévenir la contamination croisée.

Les études de nettoyage / décontamination doivent prendre en compte la contamination microbiologique et en endotoxines. Enfin les procédures de nettoyage doivent être surveillées à intervalles appropriés après leur validation, pour s'assurer que de telles procédures sont efficaces lors de leur utilisation en production de routine.

Les locaux pour être propres doivent être conçus avec des matériaux non relargants et compatibles, de sorte à ne pas accumuler les contaminants (comme une remontée en plinthe) et doivent enfin être lisses et facile à nettoyer.

En conclusion une salle propre le reste si :

- **Les surfaces sont propres et facilement nettoyables,**
- **L'air est filtré et sa qualité contrôlée,**
- **L'activité est non contaminante, donc réfléchie.**

3.4. Validation du procédé et de l'aseptie

Les procédés aseptiques doivent faire l'objet de validations périodiques afin de démontrer que les équipements utilisés, les locaux où se déroulent les opérations, le personnel impliqué et les opérations réalisées conduisent à l'obtention de produits stériles. La validation des procédés aseptiques se fait en deux étapes par la validation du process et la validation de l'aseptie.

3.4.1. La validation du process

La validation du process est réalisée avec un minimum 3 lots consécutifs de tailles identiques aux lots industriels. Pour celle-ci, il est vérifié la conformité des paramètres définis et la conformité des contrôles à libération. Cette validation ne sera pas développée dans le cadre de cette thèse.

3.4.2. La validation de l'aseptie

Les opérations de production aseptique doivent être validées par des Tests de Remplissage Aseptique (TRA) ou *Media Fill Test* (MFT) ou encore *Aseptic Process Simulation* (APS). Dans le cadre d'un TRA le produit est remplacé par un milieu de culture favorisant le développement bactérien. Les TRA peuvent être réalisés pour des liquides mais aussi pour des poudres (en répartissant du milieu de culture avec de la poudre). Le choix du milieu de culture dépend d'une part de la forme pharmaceutique du produit et d'autre part de la sélectivité, de la limpidité, de la concentration et de l'aptitude à la stérilisation du milieu nutritif. On peut par exemple utiliser le milieu de culture Trypticase Soja. En cas de contamination lors de la répartition, il y a développement du microorganisme et présence d'un trouble dans le milieu.

Le TRA correspond ainsi à la simulation du procédé de routine pour vérifier que les opérations de production conduisent à des produits stériles. Il est réalisé dans des conditions de production identifiées comme étant les plus défavorables afin de prouver que même dans les conditions les plus défavorables, l'asepsie du produit est maintenue. En exemple de conditions défavorables (*worst-case*), on peut citer le nombre d'opérateurs présents en même temps dans le bloc, la durée de répartition et le format de répartition.

Les TRA sont réalisés selon les cas suivants :

- Validation initiale d'un nouvel équipement ou d'une nouvelle ZAC avec 3 TRA consécutifs conformes,
- Validation périodique des équipements par ligne de production avec 1 TRA tous les 6 mois maximum pour chaque équipe et chaque procédé,
- Validation d'un changement impactant l'asepsie du procédé avec un TRA exceptionnel,
- Rupture des conditions environnementales de la ZAC sur évaluation.

D'autre part, l'habilitation du personnel travaillant en ZAC doit être réalisée chaque année avec la participation à un TRA conforme.

La durée d'un TRA doit être représentative de la durée d'un lot de production et sa taille va dépendre de celle des lots de routine :

- Pour les lots inférieurs à 5000 unités, le nombre d'unités remplies conforme en TRA doit être au moins égal à la taille d'un lot de production. Aucun contaminant ne doit être détecté.
- Pour les lots de production de taille comprise entre 5000 et 100 000 unités, le nombre d'unités remplies conformes en TRA doit être au moins égal à 10% de la taille d'un lot de production avec un minimum de 5000 unités remplies conformes. Pour cette taille, la présence d'une unité contaminée doit conduire à une enquête incluant la possibilité de répéter le TRA. La présence de deux unités contaminées entraîne une revalidation après enquête.
- Pour les lots de taille > 100 000 unités, le nombre d'unités remplies conformes en TRA doit être égal à 10% de la taille d'un lot de production maximum. Pour cette taille, la présence d'une unité contaminée doit conduire à une enquête et la présence de deux unités contaminées entraînent une revalidation après enquête.

Les prérequis pour la réalisation d'un TRA sont :

- La qualification conforme des équipements et des zones à atmosphère contrôlée,
- L'habilitation du personnel au poste de travail,
- L'habilitation du personnel à l'habillage,
- L'habilitation du personnel à la lecture TRA.

3.4.3. Les spécificités d'un TRA

La réalisation d'un TRA présente certaines spécificités :

- Le classement des unités,
- Les contrôles en cours de production simulés,
- Les interventions planifiées,

- Le monitoring environnemental plus soutenu,
- Les prélèvements pour analyses microbiologiques,
- La simulation de l'activité et des arrêts,
- La supervision qualité,
- La réconciliation.

D'autre part, les unités vont être classées en 3 catégories :

- Les unités remplies conformes,
- Les unités remplies mises au rebut (suite à une intervention dans la doseuse ou à une alarme du monitoring),
- Les unités jetées car mal bouchées ou vides. Les unités non conformes mises au rebut sont à différencier des conformes pour permettre d'identifier la cause d'une contamination éventuelle.

Les interventions sont intégrées au planning annuel en fonction de leur criticité et de la fréquence de survenue probable en cours de répartition (voir la liste des interventions en annexe 1). Certaines interventions sont planifiées sur tous les TRA, d'autres sont planifiées périodiquement sur 1 à 2 TRA par an et par ligne. Il existe aussi des situations comme un nombre important de personnes présentes en bloc. Elles sont planifiées sur au moins 1 TRA/ an. Un programme est fourni aux opérateurs pour chaque TRA.

Lors d'un TRA, le monitoring environnemental est plus soutenu que lors de la production de routine mais il n'y a pas de prélèvement pour test de stérilité car chaque unité est inspectée après incubation pour déceler une éventuelle contamination. Par rapport à la production de routine, les prélèvements supplémentaires correspondent au :

- Test de stérilité du milieu qui permet de vérifier en cas de pousse si la contamination provient ou non du milieu utilisé,

- Test de fertilité qui permet par le prélèvement du milieu de culture en fin de lot de prouver que l'absence de contamination n'est pas due à un milieu infertile,
- Test de stérilité des articles de conditionnement qui consiste à prélever des articles de conditionnement utilisés pendant le TRA afin de vérifier en cas de pousse si la contamination provient ou non des articles de conditionnement.

Pendant toute la réalisation du TRA, l'Assurance Qualité doit être présente pour supervision des opérations comme l'exige les BPF. La supervision a pour but de vérifier le bon déroulement des différentes étapes de la production du TRA, d'aider à l'investigation en cas d'unités contaminées et de proposer des améliorations des pratiques.

Le nombre de seringues conformes et mises en rebut doit être identique au nombre de seringues mises en incubation et au nombre de seringues lues afin que la réconciliation soit conforme. En cas de perte d'unité, il n'est pas possible de conclure quant à la conformité du TRA.

Une fois les seringues divisées, elles doivent être mises en incubation en étuve dans un délai de moins de 24h après la fin de la répartition. La première incubation est réalisée à une température de 22,5 ± 2,5 °C pendant 7 jours, bouchons vers le bas. La deuxième incubation est réalisée à une température de 35,5 ± 2,5 °C à nouveau pendant 7 jours, bouchons vers le haut. Après la seconde incubation, les unités sont lues par des personnes habilitées. Puis les dossiers de lot sont revus par l'Assurance Qualité et la décision d'accepter ou de refuser le TRA est alors prise. Un TRA peut être déclaré accepté, invalidé ou refusé selon sa lecture, la revue du dossier de lot et les résultats de *bioburden* et de fertilité. Pour qu'un TRA soit déclaré conforme, il faut qu'aucune unité ne soit contaminée. Une unique unité contaminée peut être acceptée sans revalidation avec enquête approfondie. D'autre part, il faut qu'un test de fertilité soit réalisé et conforme afin de confirmer que le milieu permet le développement microbien. Il faut également que tous les évènements réalisés soient tracés dans le dossier de lot, que les interventions planifiées aient été réalisées et que la réconciliation soit conforme à l'unité près.

Quelle que soit la taille du lot, des contaminations microbiennes sporadiques peuvent indiquer un faible niveau de contamination qui doit faire l'objet d'une enquête. L'enquête menée suite à des non conformités avérées doit intégrer l'évaluation du risque de non-stérilité des lots fabriqués depuis le dernier test de simulation de répartition aseptique conforme. En cas de résultat non-conforme sur une unité intègre, tous les lots produits depuis le dernier TRA conforme de la ligne sont bloqués. Une investigation doit être réalisée pour rechercher la cause probable de la contamination. Des actions correctives en rapport avec la cause doivent être déterminés et mises en place pour éviter la récurrence du problème. L'impact doit être évalué afin de statuer sur les lots produits. Enfin un ou plusieurs TRA doivent être replanifiés selon l'investigation pour revalidation de l'aseptie.

En conclusion de cette deuxième partie, la réussite d'une ZAC va dépendre de la cohérence entre la disposition des locaux (circuits et sas), de la qualité des structures, du traitement de l'air, de l'utilisation des tenues, de la formation du personnel, du nettoyage et de la désinfection, de l'entretien et des contrôles périodiques. Cette réussite est validée périodiquement par la réalisation de TRA.

4. Gestion des anomalies

Tout écart constaté par rapport à une spécification, aux BPF, à la documentation, aux dossiers d'enregistrement, et/ou tout défaut affectant le produit ou le système doit faire l'objet d'une déviation qualité. Ces écarts ou défauts peuvent être identifiés à tout moment lors de la production, l'analyse, le transport, le stockage et la distribution. Lorsqu'une anomalie est détectée, une investigation doit être entreprise afin d'identifier la ou les causes et engager les actions correctives et/ou préventives correspondantes.

4.1. Emission, gestion et suivi des déviations qualité

Lors de la détection d'un écart nécessitant l'émission d'une déviation où une fiche anomalie doit être créée dans un délai de 24h à partir du moment de la détection par la personne ayant

détectée l'anomalie. Lors de la création, une description de l'anomalie doit être réalisée. La fiche anomalie est ensuite approuvée ou rejetée par le responsable de secteur. Un complément d'informations peut également être demandé au créateur de l'évènement. Une fois la fiche approuvée par le responsable de secteur, elle arrive chez l'expert qualité de l'assurance qualité produit qui lui aussi doit approuver ou rejeter la fiche anomalie. S'il l'approuve, il doit réaliser une investigation préliminaire avec une identification des causes et une cotation qualité, c'est-à-dire la classer en « critique », « majeure » ou « mineure » :

- Déviation mineure : Déviation pouvant avoir un impact BPF/GMP (*Good Manufacturing Practice*) sur un système, une utilité, un équipement, du matériel, un composant, l'environnement ou la documentation mais sans impact sur la qualité, la sécurité et l'efficacité du produit ainsi que sur l'aspect réglementaire.
- Déviation majeure : Déviation présentant un impact sur une ou plusieurs étapes non critiques du process et/ou anomalie constituant un non-respect des BPF/GMP mais sans impact sur la qualité, la sécurité et l'efficacité du produit ainsi que sur l'aspect réglementaire.
- Déviation critique : Déviation avec un impact potentiel ou avéré sur une étape critique du process et/ou anomalie pouvant remettre en cause l'asepsie du produit et/ou anomalie pouvant être citée comme critique par les autorités de santé concernées.

La cotation qualité est fonction de la sévérité, de l'occurrence et de la détectabilité de l'anomalie (voir annexe 2). Si la cotation est critique, le lot sera mis en quarantaine jusqu'à évaluation de l'impact. Selon l'investigation préliminaire, une demande d'investigation supplémentaire peut être demandée à un responsable d'investigation.

L'investigateur est responsable de la conduite de l'investigation (recherche des causes, propositions d'actions correctives et/ou préventives et analyse de l'impact produit). Il peut demander à un ou plusieurs contributeurs (services supports) d'apporter des informations et

documentation supplémentaires (résultats d'analyse, photos…) nécessaires pour compléter l'investigation. L'investigateur pilote l'investigation et est responsable de l'organisation de la documentation jointe. Il doit récolter et retranscrire toutes les informations en lien avec l'anomalie.

L'investigation doit permettre :

- De compléter, de confirmer ou d'infirmer la liste des lots potentiellement impactés,
- D'identifier la ou les causes de l'anomalie et prendre les mesures nécessaires pour garantir la qualité du lot,
- De mettre en place une ou plusieurs actions préventives pour éviter la récurrence de l'anomalie,
- D'évaluer l'impact réglementaire.

L'investigateur conclut son investigation en récapitulant tous les arguments assurant l'absence d'impact qualité. Au vu de tous ces éléments l'expert qualité doit ensuite conclure sur l'impact qualité du produit.

Tout traitement d'une déviation qualité doit être réalisé dans un délai de 30 jours entre la date d'acceptation et de clôture de l'investigation. Une extension de 30 jours est possible, 2 fois au maximum. Chaque extension doit être justifiée et accompagnée d'un rapport intermédiaire. Cependant pour la libération d'un lot, toutes les déviations l'impactant doivent être clôturées.

Le logigramme du processus des déviations qualité (figure 30) représentent les étapes de création de fiche d'anomalie, évaluation/acceptation, investigation préliminaire et investigation complémentaire.

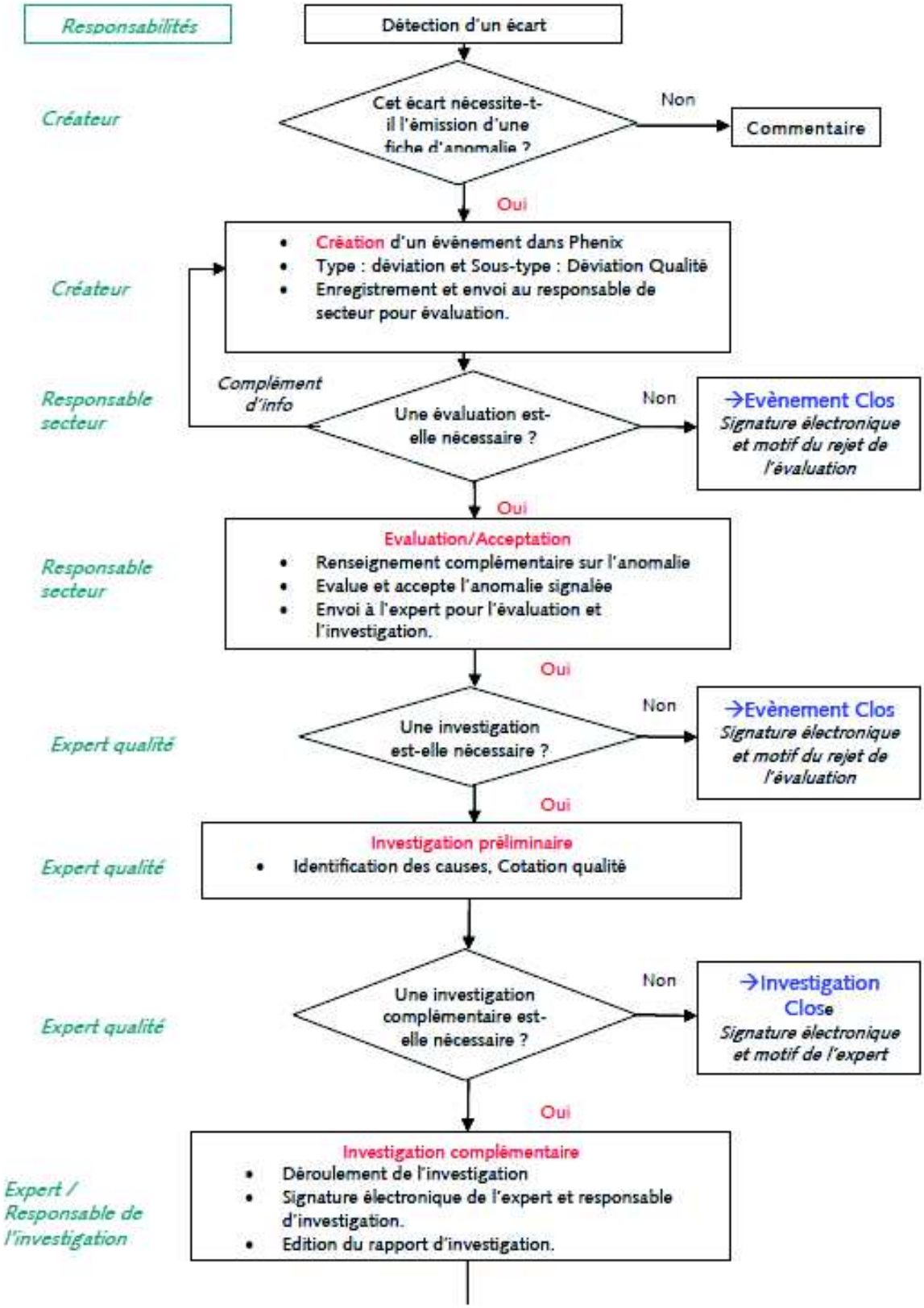


Figure 30 : Logigramme du processus des déviations qualité [11]

4.2. Mise en place de CAPA en réponse à ces anomalies

La méthode CAPA : *Corrective Action Preventive Action* correspond à la mise en place d'une mesure afin d'éviter la reproduction d'une déviation critique/majeure ou récurrente. La CAPA peut consister en une resensibilisation ou information d'un ou plusieurs opérateurs, une modification de procédure afin de changer les pratiques applicables ou encore un changement d'organisation. Si une CAPA est nécessaire, elle doit être créée avant la fin de l'investigation de l'évènement qualité associé. La tâche est ensuite acceptée ou refusée par le responsable d'implémentation qui peut également demander un complément d'information. Une fois acceptée par le responsable d'implémentation, la tâche est approuvée par un expert qualité. Le responsable d'implémentation peut alors réaliser son action qui sera vérifiée par l'expert qualité qui pourra ensuite clôturer la CAPA.

L'étendue de l'investigation et la définition de CAPA est fonction de la criticité de l'anomalie à savoir que :

- Pour toutes les déviations mineures : une investigation concise est suffisante (la définition de CAPA n'est pas obligatoire),
- Pour les déviations majeures ou critiques : une investigation exhaustive avec recherche de CAPA pertinente est obligatoire.

Suite au processus des déviations qualité, le logigramme du processus des CAPA reprend les éléments expliqués ci-dessous (figure 31).

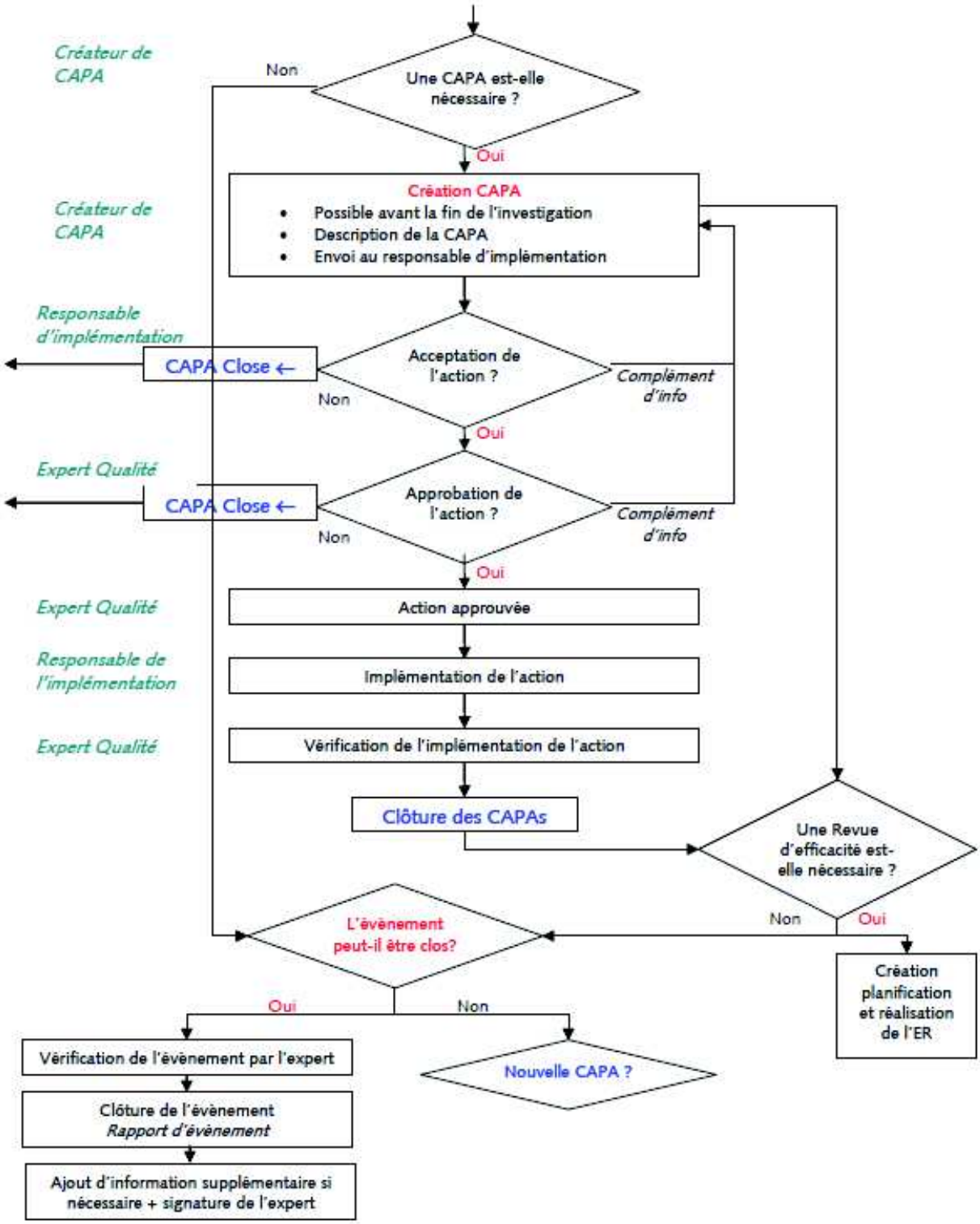


Figure 31 : Logigramme du processus des CAPA [11]

Partie III –Cas d'un Test de Remplissage Aseptique non conforme

1. Le médicament

1.1. Propriétés pharmacodynamiques

Le Lovenox® contient une substance active appelée enoxaparine. L'enoxaparine est une héparine de bas poids moléculaire (HBPM), ce qui signifie qu'elle a subi un fractionnement peptidique, dans laquelle les activités antithrombotiques et anticoagulantes de l'héparine standard ont été dissociées : l'activité anticoagulante (anti-Xa) est plus élevée que l'activité anti-thrombinique (anti-IIa). Comme pour l'héparine standard non fractionnée, les activités anti-Xa et anti-IIa résulte de l'action de l'enoxaparine sur l'antithrombine III (figure 32). Cependant, en raison du fractionnement peptidique, l'activité anti-Xa est significativement plus élevée que l'activité anti-IIa (ratio 3.8 pour l'enoxaparine). Dans le cas de la thrombine (II), la molécule d'enoxaparine, fractionnée, doit entrer en contact à la fois avec le facteur antithrombine III et à la thrombine activée (IIa), alors que dans le cas du facteur Xa, au contraire, le contact entre l'enoxaparine et l'antithrombine III suffit à accélérer l'inactivation, d'où l'action prépondérante anti Xa de l'HBPM. L'action de l'enoxaparine permet ainsi d'empêcher la formation de fibrine, diminuant ainsi la solidité du clou plaquettaire à l'origine des caillots.

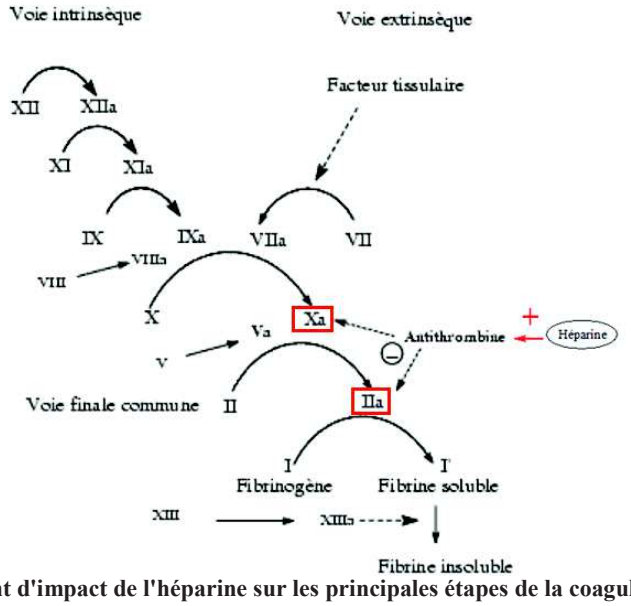


Figure 32 : Point d'impact de l'héparine sur les principales étapes de la coagulation [27]

1.2. Ses indications

L'enoxaparine commercialisée sous le nom Lovenox® (figure 33) est utilisé en voie sous-cutanée dans la prise en charge des pathologies suivantes :

- Traitement préventif (1 injection par jour), associé à l'utilisation des dosages 20 et 40mg :
    - Prévention de la maladie thrombo-embolique veineuse : en chirurgie, en médecine (patient alité) et chez les patients atteints de cancers,
    - Prévention de la coagulation dans les cas de la circulation extracorporelle et de l'épuration extra-rénale.
- Traitement curatif (2 injections par jour), associé à l'utilisation des dosages 60, 80, 100, 120 et 150 mg :
    - Des thromboses veineuses profondes (phlébite…),
    - Des embolies pulmonaires,
    - De l'infarctus du myocarde.



Figure 33 : Boîte de Lovenox®

1.3. Le principe actif

L'enoxaparine est une protéine extraite de l'intestin du porc puis retraitée chimiquement par la branche chimie du groupe Sanofi. L'Enoxaparine retraitée est ensuite envoyée aux centres de production de Lovenox® de Sanofi, à savoir celui de Maisons Alfort en région parisienne, celui de Le Trait en Haute Normandie et celui de *Csanyik* en Hongrie (figure 34).

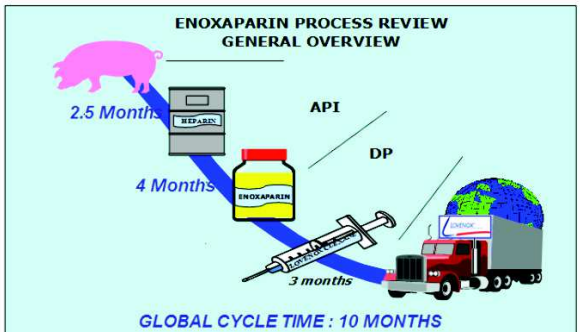


Figure 34 : Process global de production de Lovenox® [11]

Tous les dosages sont produits sur le site de Sanofi Maisons-Alfort : 20, 30, 40, 60, 80, 90, 100, 120, 150 mg.

2. Description de l'évènement

Un TRA a été divisé en novembre 2016, sur la ligne R1 en tant que lot de validation de routine pour le procédé aseptique du Lovenox®. La division du TRA, pour lequel le produit a été remplacé par un milieu de culture favorisant le développement bactérien, s'est déroulée sur 5 équipes, pour une taille de lot de 15476 seringues.

A la lecture finale, fin novembre, trois seringues suspectes, présentant un trouble, ont été détectées dans les tubs 81, 83 et 91 (figure 35). Ces seringues ont été transférées au laboratoire de microbiologie et les germes identifiés sont les suivants :

- *Staphylococcus cohnii* identifié dans deux des trois seringues,
- *Kocuria palustris* identifié dans la 3ème seringue.

Une fiche d'anomalie a donc été ouverte.



Figure 35 : Détection de 3 seringues troubles à la lecture TRA [11]

Les TRA divisés ces 10 dernières années ont été recensés et aucun évènement similaire n'a eu lieu sur toutes les lignes de remplissage (R1, R2, R3 et R4). Depuis 2007, 132 TRA ont ainsi été réalisés, dont 31 sur R1, avec plus de 10 000 seringues remplies pour chacun d'eux. Sur plus de 1 680 379 unités divisées pendant les 10 dernières années, seules les 3 seringues de ce TRA ont été détectées troubles.

3. Investigation

3.1. Rappel sur le process

Le Lovenox® est une solution d'enoxaparine dissoute dans de l'EPPI. La solution est filtrée deux fois sur des filtres de 0,22 µm et est ensuite divisée de façon aseptique en seringues en zone conventionnelle pour R1 à R4. La technologie utilisée pour la remplisseuse R1 est ainsi un remplissage aseptique en salle propre (classe B entourant A).

3.2. Rappel sur les TRA

La validation de routine du procédé aseptique par les TRA est réalisée tous les 6 mois. L'objectif est de simuler toutes les interventions possibles pouvant avoir lieu lors du processus de remplissage en routine et le temps de remplissage maximum pour le processus de remplissage de routine. Les seringues conformes et non conformes sont incubées selon une procédure prédéfinie et toutes sont évaluées pour la présence de croissance microbienne.

3.3. La revue du dossier de TRA

Le dossier de lot du TRA a été revu dans le but de collecter des informations concernant les interventions pouvant être en lien avec l'anomalie et les opérations de nettoyage.

Un résumé est fourni par équipe dans le tableau 14, incluant les opérations de nettoyage en violet, les interventions non planifiées en bleu, les numéros d'identification des tubs sans seringues contaminées en vert et avec des seringues contaminées en rouge.

04/11/16 01h00 à 02h40	04/11/16 03h11 à 05h16	04/11/16 07h32 à 11h26	04/11/16 13h23 à 16h28	04/11/16 19h32 à 21h28	05/11/16 01h23 à 03h38
Montage de la doseuse	Sub 1	Sub 2	Sub 3	Sub 4	Sub 5
I1 : Montage doseuse : PNR, pompes et aiguilles **I2** : Connexion cuve de division / PNR **I3** : Remplissage de la trémie en joints de piston **I29** : Changement de PNR et réglage de la pression	**I4** : 8 dégagements de joints de piston collés sur les rampes primaires du bol, pendant 15 minutes : Tubs 10 à 17 Nettoyage **I19** : Redressement d'un poussoir : Tubs 18 à 19 Nettoyage	**I6** : 8 dégagements de joints de piston au niveau de la butée, rampe et fourchette pendant 15 minutes : Tubs 22 à 27 Redressement aiguilles 9 et 10 : Tubs 28, ajustement de la hauteur de bulle : Tub 29 Nettoyage **I8** : 8 ouvertures de cage avec simulation de tubes levés et /ou d'enfoncement, en moins de 15 minutes : Tubs 30 à 36 Nettoyage 2nd redressement de l'aiguille n°9 : Tub 38R Nettoyage **I32** : Réglage du bras support **I22** : Changement d'un jeu de tubes et poussoirs : Tub 39R **I5** : Nettoyage des poussoirs, Nettoyage **I23** : Redressement d'une aiguille : Tubs 40 et 41, Nettoyage **I28** : Réglage de la butée pour la prise des joints : Tub 42R, Nettoyage **I26** : Réglage de la pièce intermédiaire, Tubs 43 et 44, Nettoyage	**I6** : 8 dégagements de joints de piston au niveau de la butée, rampe et fourchette pendant 15 minutes : Tubs 47 à 54, Nettoyage **I4** : 8 dégagements de joints de piston collés sur les rampes primaires du bol, pendant 15 minutes : Tubs 55 à 62 Nettoyage **I23** : redressement d'une aiguille : Tubs 63 et 64, Nettoyage **I22** : changement d'un jeu de tubes et poussoirs : Tub 65R, Nettoyage **I34** : Reconnexion du tuyau d'alimentation évent azote bouchage, Tub 68R, Nettoyage **I31** : Réglage fourchette, Tub 69R, Nettoyage	**I8** : 8 ouvertures de cage avec simulation de tubes levés en moins de 15 minutes : Tubs 70 à 77 **I34** : Reconnexion du tuyau d'alimentation évent azote bouchage, Tub 78R, Nettoyage **I18** : changement d'un couple pompe/aiguille, redressement aiguille n°10, Tub 79R, Nettoyage **I4** : 8 dégagements de joints de piston collés sur les rampes primaires du bol, pendant 15 minutes, 2nd redressement aiguille n°10 : Tubs 80 à 87 Tubs 81 et 83 Nettoyage **I19** : Redressement d'un poussoir Tubs 88 et 89 Nettoyage	**I20** : Changement complet du système de bouchage hors circuit azote **I33** : Changement du tuyau d'alimentation ou des évents du TIL, Tub 91R, Nettoyage **I24** : Prélèvement de milieu pour test de fertilité, Nettoyage
	Tubs divisés : 1 à 22	Tubs divisés : 23 à 46	Tubs divisés : 47 à 69	Tubs divisés : 70 à 89	Tubs divisés : 90 à 97

Tableau 14 : Revue du dossier de lot partie division du TRA

Nous remarquons que lors de la subdivision 2, le 04/11/16 de 07h32 à 11h26, deux interventions ont eu lieu concernant l'aiguille n°9 pendant la subdivision 2 :

- Un redressement de l'aiguille sur le tub n°28
- Un redressement de l'aiguille sur le tub n°38R

Cependant, aucun évènement inhabituel n'a été reporté et toutes les seringues divisées après ces deux interventions étaient conformes.

La 1ère seringue trouble a été trouvée sur le tub qui a été divisé quelques minutes après le changement du couple de pompe/aiguille n°10 (appelé intervention I18) de 20h13 à 20h26 lors de la subdivision 4, le 04/11/16 de 19h32 à 21h28.

Dans le tableau 15 figure les détails sur le déroulement de l'intervention.

Tableau 15 : Déroulement de l'intervention changement de couple pompe / aiguille

Ce qui a été fait	Ce qui aurait dû être fait
Le tuyau azote a été déconnecté du côté de la nourrice azote	Sur R1, le tuyau azote aurait dû être déconnecté du côté de l'aiguille
La nouvelle aiguille à monter était fournie avec un tuyau de 19 cm déjà connecté	La nouvelle aiguille à mettre en place aurait dû être fourni avec un tuyau d'une longueur de 25 cm déjà connecté
L'aiguille a été retirée alors que le tuyau azote était toujours connecté à elle	L'aiguille aurait dû être retirée sans son tuyau azote. Selon la procédure, il aurait dû rester connecté à la nourrice azote
L'aiguille et la nourrice azote ont été posées sur la surface de la doseuse	Uniquement l'aiguille aurait dû être retirée et posée sur la surface de la doseuse
L'opérateur a installé la nouvelle aiguille à la 10ème position	-
La connexion était impossible à cause du tuyau azote trop court	L'ancien tuyau azote aurait dû être maintenu. Le nouveau provenant avec la nouvelle aiguille n'aurait pas dû être utilisé selon la procédure
L'opérateur a appelé son responsable. Sur une incompréhension, le responsable a donné son autorisation pour réaliser l'intervention	Le responsable aurait dû se déplacer en ZAC ou à la fenêtre afin de comprendre la situation et observer la réalisation de l'intervention
L'opérateur a pris le tuyau azote qui avait été retiré et la posé sur le bâti de la doseuse déconnecté de l'ancienne aiguille puis la reconnecté entre la nourrice azote et la nouvelle aiguille	Cette opération n'aurait pas dû avoir lieu

La figure 36 schématise l'intervention changement de couple pompe / aiguille n°10.

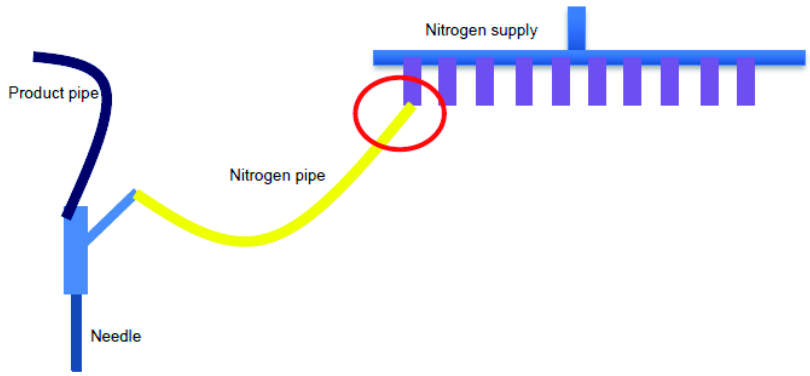


Figure 36 : L'intervention contaminante

Les trois seringues troubles ont été trouvées sur les tubs 81, 83 et 91R:

- Tub 81et 91 : *Staphylococcus cohnii,*
- Tub 83: *Kocuria palustris.*

Les 3 seringues contaminées proviennent du couple pompe / aiguille n°9. La connexion du tuyau au point n°10 est très proche du point n°9 (figure 37), à environ 1-1,5cm l'une de l'autre.

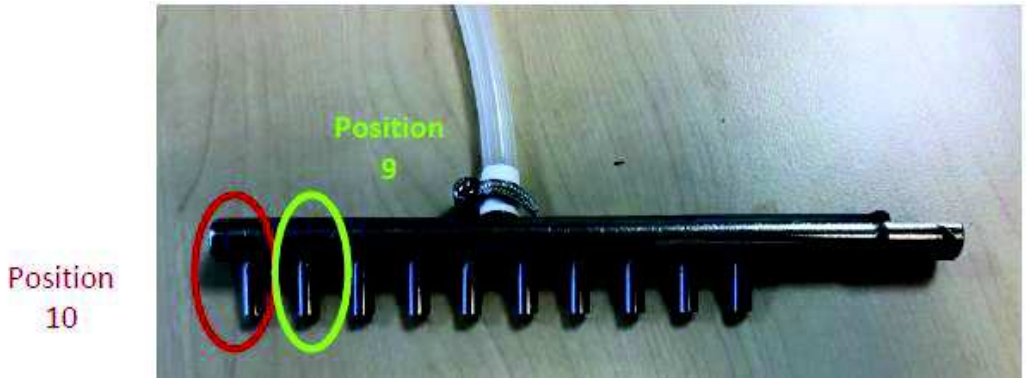


Figure 37 : Nourrice azote

D'autre part, les 3 tubs contenant ces seringues ont été remplis à intervalles courts, avec une cadence de 2 tubs par minute (figure 38).

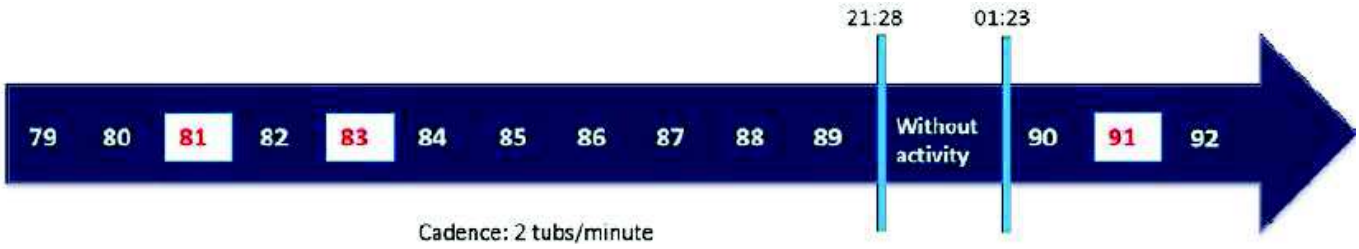


Figure 38 : Cadence de remplissage

Un arrêt de l'activité explique pourquoi le tub 91 a été rempli plus tard.

La méthode pour la réalisation de cette intervention sur le couple pompe/aiguille n°10 est en discordance avec la procédure opératoire décrite. Cependant les pratiques inappropriées durant l'intervention ont été décrites dans le dossier de lot. La gestuelle pendant l'intervention a perturbé le flux luminaire et serait très probablement la cause de la contamination des 3 seringues.

3.4. Les microorganismes

L'identification des microorganismes par génotypie et phénotypie a démontrée la présence de *Staphylococcus cohnii* pour les tubs 91 et 81 et la présence de *Kocuria spp* pour le tub 83.

Kocuria spp. est une bactérie à Gram positif, microorganisme aérobie, trouvé dans la flore de la peau des mammifères. Les contaminations signalées entre le 1er janvier 2016 et le 29 novembre 2016, concernant Kocuria spp. sont résumées ci-après :

➔ 42 contaminations en zone de production, dont 5 pour R1, distribuées comme ceci (tableau 16) :

Tableau 16 : Répartition des contaminations impliquant *Kocuria spp* sur R1

	Gants	Surface	Vêtements
Classe A	2	-	-
Classe B	-	2	1

La dernière contamination a été détectée en septembre 2016.

Staphylococcus cohnii est un microorganisme appartenant au groupe des staphylocoques coagulase-négative. Il est composé de deux principales sous-espèces qui sont définies sur la base de leurs caractéristiques : *Staphylococcus cohnii subsp. cohnii* et *Staphylococcus cohnii urealyticus*. C'est un colonisateur occasionnel de la peau. Les contaminations signalées entre le 1er janvier 2016 et le 29 novembre 2016, concernant *Staphylococcus cohnii* et *Staphylococcus cohnii urealitycus* sont résumés ci-après :

➔ 5 contaminations en zone de production, dont 2 pour R1 distribuées comme ceci (tableau 17) :

Tableau 17 : Répartition des contaminations impliquant *Staphylococcus cohnii* sur R1

	Volumétrique	Surface
Classe B	1	1

La dernière contamination a été trouvée en mars 2016.

3.5. Monitoring microbiologique de l'environnement et du personnel

3.5.1. Monitoring microbiologique pendant le TRA

3.5.1.1. Monitoring microbiologique du personnel

290 prélèvements ont été réalisés en classes A et B, du montage à la fin de la division du lot de TRA sur R1. En classe A, aucune contamination n'a été relevée. En classe B, 4 contaminations avec 6 UFC au total ont été relevées. Cependant aucune n'excédait la limite d'action requise pour leur classe de propreté.

Toutes les contaminations ont été identifiées et comparées à celles trouvées dans les 3 seringues troubles. Aucun microorganisme similaire n'a été retrouvé.

3.5.1.2. Monitoring microbiologique de l'environnement

144 prélèvements ont été réalisés en classe A et B, du montage à la fin de la division du lot de TRA sur R1. En classe A, aucune contamination n'a été relevée. En classe B, une contamination à 2 UFC a été détectée lors d'un contrôle volumétrique du sas intermédiaire pour une spécification inférieure à 5 UFC.

Pour la classe C, parmi les contaminants détectés, un *Kocuria palustris* a été détecté lors d'un contrôle volumétrique de l'air dans le sas habillage le 4 novembre 2016 à 13h30. Une identification a été réalisée dans le but de le comparer avec le cas isolé de la seringue trouble tub 83. La conclusion de cette identification est que les deux cas correspondent à deux souches différentes de la même espèce.

3.5.2. Tendance microbiologique de la ZAC

Les tendances du monitoring environnemental pour R1 d'octobre 2015 à novembre 2016 sont détaillées dans le graphe de la figure 39.

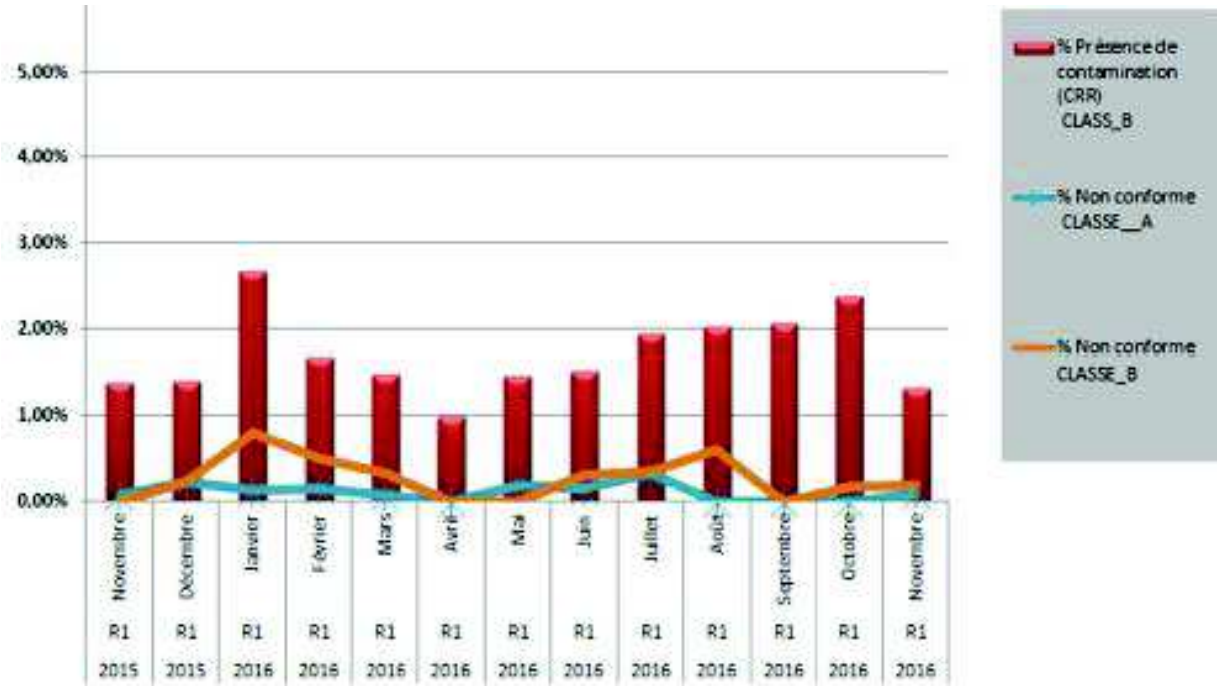


Figure 39 : Tendance environnementale pour R1 de la période du 10/2015 à 11/2016 [11]

Selon l'USP <1116> [28], les limites sont les suivantes (tableau 18) :

Tableau 18 : Limites des taux de contamination pour le monitoring environnemental

	Monitoring environnemental		
	Isolateur / cRABS	Class A	Class B
USP <1116>	0,1%	1%	5%

En ce qui concerne les taux de contamination en classe A et B, les tendances des 12 derniers mois restent dans les limites prévues par l'USP <1116>. Malgré une légère augmentation, il n'y a pas de tendance atypique en 2016 par rapport aux tendances de 2015 (1,32% en moyenne en 2015 contre 1,78% en 2016).

3.5.3. Tendance microbiologique du personnel

3.5.3.1. Tendance microbiologique du personnel en général

Les tendances du monitoring du personnel depuis octobre 2015 à novembre 2016 sont détaillées dans le graphe de la figure 40 :

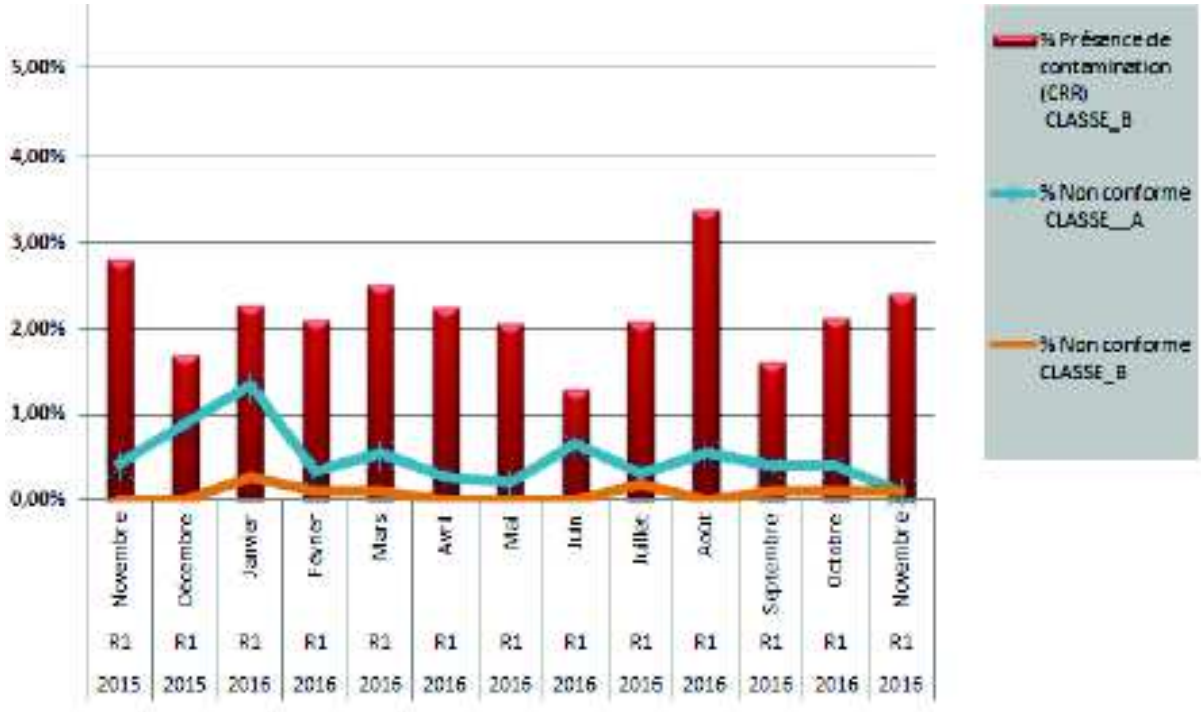


Figure 40 : Tendance microbiologique du personnel depuis octobre 2015 à novembre 2016 [11]

En ce qui concerne le taux de contamination en classe B, les tendances des 12 derniers mois restent dans les limites prévues par l'USP <1116>. Une légère diminution peut être observée en 2016 par rapport aux tendances de 2015 (1,89% en moyenne en 2015 contre 1,76% en 2016). Il y a une excursion en janvier 2016 dans la classe A (1,34%).

3.5.3.2. Focus sur les opérateurs ayant travaillés pendant la subdivision 4

Le monitoring des deux opérateurs présents dans la zone de remplissage pendant l'intervention I18 a été examiné plus précisément.

Concernant l'opérateur 1, le graphique des non-conformités est présenté avec la figure 41.

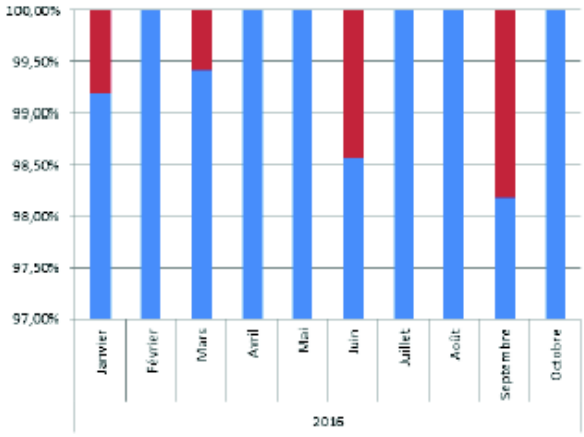


Figure 41 : Tendance microbiologique de l'opérateur 1

En septembre 2016 : 3 UFC sur gants (*Kocuria palustris, Luteimonas species, Janibacter hoylei*) et 1 UFC sur gants (*Staphylococcus lentus*).

Du 1er janvier 2016 au 28 novembre 2016, un total de 1118 échantillons ont été prélevés sur cet opérateur (gants et vêtements). Plus de 1093 échantillons ne présentaient aucune contamination (98%) et 1112 échantillons se situaient dans les spécifications (99%).

Concernant l'opérateur 2, le graphique des non-conformités est présenté avec la figure 42.

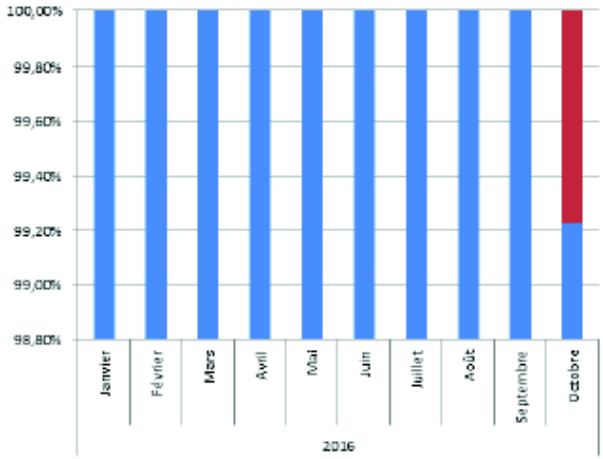


Figure 42 : Tendance microbiologique de l'opérateur 2

En octobre 2016 : 1 UFC sur gants (*Staphylococcus epidermidis*)

Du 1er janvier 2016 au 28 novembre 2016, un total de 964 échantillons ont été prélevés sur cet opérateur (gants et vêtements). Plus de 958 échantillons ne présentaient aucune contamination (99%) et 962 échantillons se situaient dans les spécifications (100%).

De plus, il n'y a eu aucun signalement de non-conformité sur les deux opérateurs dans le cadre des prélèvements gants et vêtements durant le TRA.

3.6. Monitoring particulaire

Le monitoring particulaire durant la division du lot de TRA a été revu. Durant le remplissage, la limite d'action a été dépassée deux fois : une fois pendant une intervention de la subdivision 2 et un autre durant le nettoyage en subdivision 3. Les deux dépassements concernent les particules de 5µm. Il n'y a pas eu d'alarme au-dessus des limites d'alerte ou d'action pendant la subdivision 4.

3.7. Analyse de la cause racine

L'analyse des causes racines a été effectuée selon la méthodologie des 5M.

3.7.1. Main d'œuvre

3.7.1.1. L'habillage

Tous les opérateurs sont habilités aux procédures d'habillage avec prélèvements. Ce n'est qu'après une formation réussie qu'ils reçoivent l'autorisation d'entrer en zone classée B. Un renouvellement annuel de l'habilitation est réalisé pour chaque opérateur. Les dernières habilitations annuelles des deux opérateurs présents lors de la subdivision 4 datent du :

- Opérateur 1 : 20/12/2015 puis 29/11/2016,
- Opérateur 2 : 18/11/2015 puis 17/11/2016.

3.7.1.2. La formation

La formation comprend la connaissance des procédures, le renseignement du dossier de lot selon les BPF, le comportement en salle blanche. La procédure opératoire pour l'intervention I18 n'a pas été respectée comme décrit ci-dessus. Les gestes au cours de l'intervention étaient inappropriés, ce qui a perturbé le flux laminaire et a très probablement causé la contamination des 3 seringues.

3.7.1.3. Tendances monitoring du personnel

Les résultats des tendances du monitoring des opérateurs ayant travaillé durant la subdivision 4 pour la période du 1er janvier 2016 au 28 novembre 2016 se situent dans la gamme des résultats globaux de suivi du personnel. Par conséquent, il n'y a aucun signal de non-conformité pour les deux opérateurs.

3.7.1.4. Origine humaine des microorganismes

Les deux microorganismes trouvés sont des colonisateurs de la peau. Ceci indique que la contamination provient du personnel.

3.7.1.5. Contamination des opérateurs

290 prélèvements ont été réalisées sur les opérateurs, du montage à la fin de la division, en classe A et B. Il n'y a eu aucune contamination en classe A. En classe B, 4 contaminations (6 UFC au total) ont été relevés. Il n'y a eu aucun dépassement de limite d'action. Tous les prélèvements ont été comparés aux contaminations trouvées dans les 3 seringues troubles. Aucun microorganisme similaire n'a été trouvé.

3.7.1.6. Communication verbale non claire

L'opérateur qui a réalisé l'intervention a demandé à son collègue présent en zone d'appeler son responsable. Il a expliqué par téléphone que le tuyau était trop court et a demandé l'autorisation d'utiliser le précédent. Son responsable lui a donné l'autorisation précédent sans demander plus de détails. Le responsable n'est pas venu sur place et une incompréhension s'est produite.

3.7.2. Equipement

3.7.2.1. Maintenance

Une maintenance périodique est effectuée sur la ligne. Il n'y a aucun signe indiquant que la contamination du TRA soit causée par des procédures de maintenance incorrectes.

3.7.2.2. Qualification

La ligne complète (autoclave, tunnel de pulvérisation et doseuse) est continuellement requalifiée depuis sa qualification initiale.

3.7.2.3. Historique des TRA

Depuis 2007, 27 TRA ont été divisés et libérés sur la ligne de remplissage R1. Depuis 2007, aucun des TRA n'a été échoué sur les 3 autres lignes.

3.7.2.4. Validation des filtres HEPA

La documentation concernant la validation du dernier filtre HEPA n'a montré aucun défaut qui pourrait contribuer à l'échec du TRA observé.

3.7.3. Milieu

3.7.3.1. Historique du monitoring environnemental en classe A et B

Comme décrit ci-dessus les tendances du monitoring environnemental restent inférieures aux limites prévues par l'USP.

3.7.3.2. Pas de déviations critiques ou changements majeurs

L'examen de tous les écarts et modifications n'a pas indiqué de corrélation avec l'échec du TRA de routine.

3.7.3.3. Différentes pratiques pour toutes les lignes

Différentes pratiques sont utilisées pour toutes les zones de remplissage : Les doseuses R1 et R2 sont dans deux zones classe A situées dans une même zone classée B et utilisent la même laverie. De plus les deux remplisseuses n'ont pas la même configuration. D'autre part les pratiques actuelles ne sont pas harmonisées : les circuits azote ne sont pas standardisés (connexions azote et aiguilles) pour toutes les lignes (R1 à R4). En effet, R1 et R4 (doseuses de

grande cadence) reçoivent des aiguilles pré-connectées au tuyau mais le tuyau n'est pas utilisé alors que R2 et R3 (machine de cadence moyenne) reçoivent des aiguilles seules.

3.7.4. Matériel

3.7.4.1. Articles de conditionnement

Les articles de conditionnement primaire (seringues et joints de piston) sont validés et ne peuvent pas être la cause de la contamination.

3.7.4.2. Fournisseur

L'enquête sur la validation des fournisseurs n'a révélé aucune cause à l'origine de l'anomalie.

3.7.5. Méthodes

3.7.5.1. Respect des SOP

Pendant l'intervention I18 (changement d'un couple pompe/aiguille), les étapes décrites dans les SOP (*standard operating procedures*) n'ont pas été respectées par les opérateurs.

Plusieurs incidents se sont produits :

- L'opérateur de préparation matériel a préparé le matériel comme d'habitude, cependant le tuyau fixé à l'aiguille a été coupé trop court (19 cm au lieu de 25 cm).
- Dans le cadre de l'intervention, l'opérateur a délibérément débranché le tuyau au niveau de l'approvisionnement en azote au lieu de le débrancher au niveau de l'aiguille. Il a donc enlevé l'aiguille avec le tuyau associé qui aurait dû rester brancher sur la nourrice azote et l'a placé sur le bâti de la doseuse. Il a récupéré une nouvelle aiguille stérile, équipée du tuyau trop court et l'a positionné au 10ème emplacement mais n'a pas pu connecter le tube d'azote à la nourrice.
- Il a donc laissé la nouvelle aiguille en place mais a enlevé le tuyau trop court. Cette opération difficile a été faite à deux mains, l'une tenant l'aiguille et l'autre enlevant le tuyau.

- L'ancien tuyau précédemment positionné sur l'aiguille a été enlevé et reconnecté sur le côté de l'aiguille et de la nourrice.

Les gestes au cours de cette intervention étaient inappropriés et ont par conséquent perturbé le flux laminaire, ce qui est très probablement la cause de la contamination des 3 seringues.

3.7.5.2. Validation de nettoyage

Pendant l'investigation, la validation de nettoyage n'a révélé aucune cause probable.

3.7.5.3. Validation du process

Pendant l'investigation, la validation du process n'a révélé aucune cause probable.

3.8. Conclusion sur les causes probables

Dans le tableau 19 sont résumés les principaux éléments du TRA.

Tableau 19 : Résumé du TRA

Date de remplissage	4 et 5 novembre 2016
Nombre de seringues remplies	Acceptées : 13640 unités, Rejetées : 1836 unités, Total 15476 unités
Interventions planifiées / non planifiées	28 interventions / 5 interventions
Unités contaminées	3
Localisation	Tubs 81, 83 et 91, tous divisés avec l'aiguille n°9
Identification	2 *Staphylococcus Cohnii* et 1 *Kocuria Palustris*
Monitoring Environnemental en classe A	Pas de contamination en classe A
Monitoring du Personnel en classe A	Pas de contamination en classe A
Monitoring Environnemental en classe B (spécifications < 5UFC)	1 contamination en classe B : sas intermédiaire avec 2 UFC
Monitoring du Personnel en classe B (spécifications < 5UFC)	1 contamination des gants : 3 UFC 3 contaminations vêtements : 1 UFC dans chaque cas

Les causes possibles sont résumées figure 43. Les causes ayant participées à l'échec du TRA apparaissent en orange.

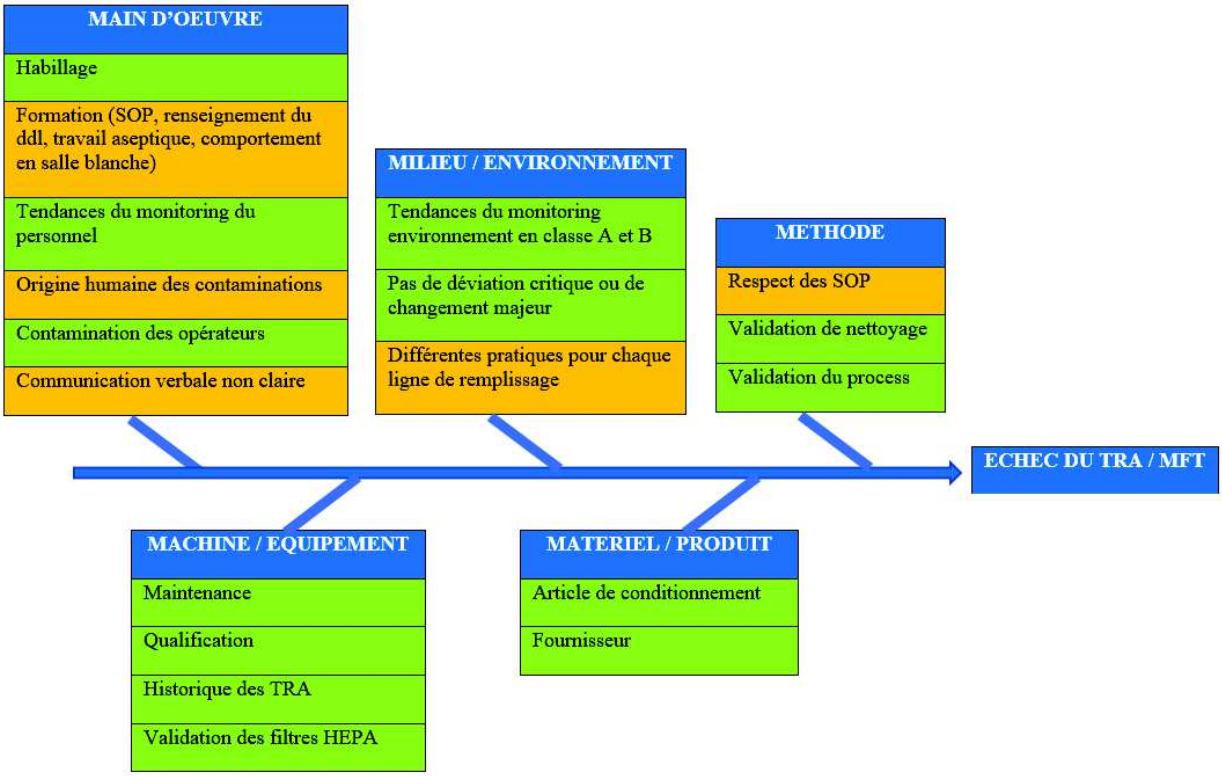


Figure 43 : Recherche des causes probables par le diagramme d'Ishikawa [11]

En conclusion, la main-d'œuvre, le milieu et les méthodes ont été identifiés comme étant les facteurs contribuant à l'échec du TRA. La réalisation l'intervention I18 dans des conditions anormales a conduit l'opérateur à avoir une gestuelle inappropriée, perturbant le flux laminaire, ce qui a très probablement conduit à la contamination des 3 seringues.

3.9. Revue des déviations et réclamations

La revue de toutes les déviations depuis le dernier TRA conforme en mai 2016 a confirmé qu'aucune déviation ne pouvait être liée à la non-conformité du TRA de novembre 2016. Alors que 10 lots ont été identifiés avec une intervention similaire, aucun écart ou problème pouvant être lié aux incidents signalés au cours du TRA n'a été signalé.

La revue de toutes les réclamations depuis le dernier TRA conforme n'a révélé aucune plainte technique du produit qui pourrait être liée à l'évènement.

3.10. Conclusions de l'investigation

A la suite de l'investigation approfondie, la cause principale la plus probable de ce TRA non conforme est liée à la coïncidence des incidents survenus lors de l'intervention I18 changement de couple pompe/aiguille.

Les dossiers de lots des lots fabriqués depuis le dernier TRA ont été examinés. Ces interventions et incidents n'ont pas été signalés. Par conséquent, il n'y a pas d'impact pour les lots déjà fabriqués.

En conclusion, la main-d'œuvre, le milieu et les méthodes ont été identifiés comme étant les facteurs contribuant à l'échec du TRA.

4. Plan d'actions

Suite aux causes détectées par l'investigation, des actions correctives en rapport ont été déterminées et mises en place pour éviter la récurrence du problème.

4.1. Actions à court terme

Pour les lots stockés sur le site : la libération des lots est stoppée en attente de l'investigation.

Pour les lots stockés dans des centres de distribution : à ce jour, selon les progrès de l'étude, aucun blocage n'est recommandé.

Pour la production à venir sur R1 : la stratégie de reprise de la production a été définie. La production de routine peut reprendre après la réalisation de 3 nouveaux TRA.

Une revalidation de la ligne à travers les 3 nouveaux TRA a été effectuée du 03/12/16 au 12/12/16. Après 14 jours d'incubation, aucune seringue trouble n'a été détectée. Les tests de fertilité sont conformes. Le statut requalifié de la ligne est confirmé. La ligne de remplissage R1 a pu de nouveau être utilisée pour la production de lots commerciaux et la libération des lots mis en quarantaine par mesure de précaution a pu reprendre.

4.2. Actions à long terme

Des actions correctives ont été définies pour corriger les paramètres qui ont défailli (milieu, méthode, mains d'œuvre) :

- Associée au milieu : Harmonisation du matériel (pompes et aiguilles) entre les lignes de répartition R1 à R4. Délai 1er semestre 2017
- Associée à la méthode : Mise à jour de la procédure d'intervention en bloc sur les remplisseuses R1 à R4 afin de préciser les différentes étapes pour l'intervention I18. Délai 1er semestre 2017
- Associée à la main d'œuvre : Réalisation d'un retour d'expérience du TRA non conforme et les opérateurs impliqués dans le TRA non-conforme doivent à nouveau participer à l'un des trois TRA de requalification. Délai : fin janvier 2017

5. Suivi du plan d'actions

Les actions correctives définies pour corriger les paramètres qui ont défailli se sont déroulées dans les délais impartis :

- Associée au milieu : mise en application de l'harmonisation du matériel (pompes et aiguilles) entre les lignes de répartition R1 à R4 réalisée le 10/04/17.
- Associée à la méthode : Mise à jour de la procédure d'intervention en bloc sur les remplisseuses R1 à R4 afin de préciser les différentes étapes pour l'intervention I18. Application de la procédure le 10/04/17.
- Associée à la main d'œuvre : Réalisation d'un retour d'expérience du TRA non conforme et les opérateurs impliqués dans le TRA non-conforme doivent à nouveau participer à l'un des trois TRA de requalification. Les opérateurs ont bien participé à l'un des trois TRA de requalification de décembre. Un retour d'expérience sous forme de resensibilisation générale a été réalisé auprès du personnel de production.

Depuis cet évènement, aucune autre unité contaminée n'a été lue en TRA.

6. Conclusion

Le TRA réalisé le 4 et 5 novembre 2016 sur la ligne de remplissage R1 a échoué avec l'identification de trois seringues troubles sur plus de 10 000 unités. Le germe *Staphylococcus cohnii* a été identifié dans deux seringues tandis que le germe *Kocuria palustris* a été trouvé dans la 3ème seringue.

La libération des lots en attente au niveau du site a été stoppée par mesure de précaution. La production a été suspendue et a repris après la réalisation de 3 nouveaux TRA conformes.

À la suite de l'investigation approfondie réalisée, la cause la plus probable pour cet échec de simulation de processus aseptique est liée à la coïncidence des incidents survenus lors de l'intervention I18 (changement de couple pompe aiguille).

Les dossiers de lot fabriqués depuis le dernier TRA conforme ont été examinés. Une telle intervention et de tels incidents n'ont pas été signalés. Par conséquent, il n'y a pas d'impact sur les lots déjà fabriqués. En conclusion, la main-d'œuvre, le milieu et les méthodes ont été identifiés comme étant les facteurs contribuant à l'échec du TRA.

La gravité du préjudice est évaluée comme mineure et la probabilité d'occurrence est considérée comme extrêmement rare. En conséquence, le risque pour le patient est faible.

Des actions correctives ont été définies pour pallier les paramètres qui ont échoué (méthode, main-d'œuvre et moyen). Entre le 3 et 12 décembre 2016, les trois essais consécutifs de simulation de processus aseptiques ont été effectués sur la ligne de remplissage R1. Après 14 jours d'incubation pour chaque essai, aucune seringue contaminée n'a été trouvée. Par conséquent, on peut affirmer que la ligne de remplissage R1 est de nouveau qualifiée d'aseptique et peut être utilisée pour la production de lots destinés au marché. La libération des lots retenus par mesure de précaution peut être reprise. Sur la base de l'enquête et des évaluations effectuées, aucune mesure sur le marché n'a été jugée nécessaire.

Conclusion générale

La fabrication des médicaments stériles impose des exigences particulières en vue de réduire au minimum les risques de contamination microbienne, particulaire et pyrogène. Ces exigences sont construites autour du fait que la garantie de la stérilité et des autres aspects de la qualité des médicaments ne repose pas uniquement sur les tests réalisés sur les produits finis. La qualité est intégrée au produit et non pas simplement testé dans le produit fini. Par conséquent, l'assurance de la stérilité signifie non seulement que le produit répond aux spécifications définitives, mais aussi qu'il a été obtenu par les mêmes méthodes et dans les mêmes conditions chaque fois qu'il est fabriqué. La fabrication des médicaments stériles requiert une surveillance de l'environnement particulaire et microbiologique et des contrôles en cours de production. Elle nécessite également des locaux adéquats, des équipements de production appropriés, conçus pour être facilement nettoyés et stérilisés. Enfin, le respect des précautions requises pour réduire la biocharge avant stérilisation est indispensable et les méthodes doivent être validées à toutes les étapes de production. Le risque le plus important de contamination lors des procédés aseptiques étant l'intervention humaine directe, il est nécessaire de limiter la présence humaine et les interventions humaines directes. Les technologies barrières ont permis par leur déploiement d'améliorer le niveau d'assurance de la stérilité de la production des médicaments stériles et contribuent indirectement à l'amélioration continue des lignes de répartition aseptiques conventionnelles. Cette amélioration continue est en grande partie dû au savoir-faire, à la formation et au comportement du personnel impliqué. En tant que structure de ces éléments, le système doit être formalisé avec des procédures soigneusement élaborées et validées et la formation doit être continue.

ANNEXE 1 - Liste des interventions

CODE	Description interventions	Classe
NP	Nettoyage + 10 min de renouvellement d'air	**A**
TIL	Test d'intégrité en ligne	**B**
I5	Nettoyage poussoirs	**A**
I7	Changement des manchettes néoprène avec nettoyage (R1, R3, et R4)	**A**
I9	Seringues soulevées ou nest trop haut	**A**
I10	Prélèvement bioburden en poche	**B**
I24	Prélèvement bioburden à la cartouche	**A**
I11	Tuyau téflon déconnecté d'une pompe, remise en place	**A**
I12	5 simulations surcharges élévation	**A**
I13	8 ouvertures de cage avec simulation aiguilles levées en moins de 15 minutes	**A**
I14	Tuyau téflon déconnecté d'une aiguille, remise en place	**A**
I15	Nettoyage des cellules de détection des joints de piston au niveau de la fourchette	**A**
I16	Changement des 5 ou 10 aiguilles	**A**
I17	Changement des ventouses	**A**
I18	Changement d'un couple pompe/aiguilles (connectés)	**A**
I19	Redressement d'un poussoir	**A**
I22	Changement d'un jeu de tubes et poussoirs	**A**
I23	Redressement aiguille	**A**
I25	Réglage hauteur des aiguilles ou hauteur de bulle (R2/R3 réglage manuel par STP et R1/R4 réglage pupitre par tous sauf opérateurs	**A R2/R3** **B R1/R4**
I26	Réglage de la pièce intermédiaire (R1/R4)	**A**
I27	Réglage des cellules photoélectriques de détection des joints au niveau de la fourchette	**A**
I28	Réglage de la butée pour prise des joints	**A**
I29	Réglage serre-flanc	**A**
I30	Réglage des guides de centrage des nests du convoyeur au niveau du cadre de transfert	**A**
I31	Réglage fourchette	**A**
I32	Démontage, déblocage ou réglage des bras support (aiguilles ou tubes/poussoirs)	**A**
I33	Changement du tuyau ou de l'évent TIL	**A**
I34	Reconnexion du tuyau d'alimentation de l'évent azote bouchage	**A**
I38	Changement joint de table	**A**
INR	Intervention non répertoriée	**A**

ANNEXE 2 - Tableaux de criticité (1/2)

Tableau de sévérité (gravité)

SEVERITE	DEFINITION	EXEMPLES
Mineur	• Anomalie pouvant avoir un impact BPF/GMP sur un système, une utilité, un équipement, du matériel, un composant, l'environnement ou la documentation mais sans impact sur la qualité, la sécurité et l'efficacité du produit ainsi que sur l'aspect réglementaire	• Récurrence d'un problème ne faisant pas l'objet d'une fiche d'anomalie • Environnement non-conforme dans les sas (impact BPF maîtrisé/impact connu) • Documentation avec données corroborantes (y compris mix-up documentaire)
Modérée	• Anomalie avec impact sur des étapes non critiques du process et/ou • Anomalie constituant un non respect des BPF avec un impact potentiel sur la qualité du produit mais sans risque d'effet indésirable	• Environnement non-conforme en classe B • Qualification (périodique) non conforme des étapes non critiques
Majeure	• Anomalie avec impact sur des étapes non critiques du process et/ou • Anomalie constituant un non respect des BPF Avec un impact potentiel sur la qualité, la sécurité, l'efficacité du produit (risque d'effets indésirables) Rq : Pour les produits sur le marché : atteinte à l'image ou la crédibilité du groupe.	• Holding time dépassé • Documentation sans données corroborantes/étapes non critiques • Rendement/Réconciliation non conforme (< 100%) • Non respect des contrôles de poids • Bioburden conforme avec germe pathogène • Dépassement du délai de dépôt du bioburden après prélèvement • Risque potentiel pour environnement de classe A non conforme
Sévère	• Anomalie avec un impact avéré ou potentiel sur une étape critique du process et/ou • Anomalie pouvant remettre en cause l'asepsie du produit et/ou • Anomalie avec un impact réglementaire Plus généralement, anomalie avec un impact potentiel sur la qualité, la sécurité, l'efficacité du produit pouvant être à l'origine d'un risque sérieux pour la santé.	• Qualification (périodique) non conforme des étapes critiques/aseptiques • Environnement non conforme en classe A • Opérations aseptiques non maîtrisées • Documentation sans données corroborantes/étapes critiques • Mix-up • Etapes critiques non-conformes (mentions variables, cycles) • Résultat laboratoire non conforme (libératoire)

ANNEXE 2 - Tableaux de criticité (2/2)

Table de l'occurrence (fréquence)

OCCURENCE	DEFINITION
Extrêmement rare	Première fois que l'évènement est observé.
Rare	Evènement isolé dans le lot concerné.
Occasionnelle	Evènement observé au maximum 1 fois par mois ou par campagne et/ou concerne un nombre d'unités groupées dans le lot.
Probable	Evènement observé 2 à 4 fois par mois ou par campagne. Répétition aléatoire de l'évènement dans les différents lots.
Quasi certaine ou inconnue	Evènement observé plus de 5 fois par mois ou par campagne. Le lot précédent et/ou suivant est aussi impacté par l'évènement.

Table de la détectabilité

DETECTABILITE	DEFINITION
FAIBLE	Contrôle aléatoire Difficile à détecter
MODEREE	Contrôle à 100% par un équipement automatique dont la performance est significativement différente de 100% ou contrôle partiel (IPC, statistique…)
ELEVEE	Contrôle à 100% par un équipement automatique dont la performance est proche de 100%. Contrôle à 100% par opérateur/lors de la revue documentaire.

Table des figures

Figure 1 : Les principales voies d'administration parentérale 7
Figure 2 : Les éléments d'une seringue pré-remplie 10
Figure 3 : Mentions présentes sur l'étui 10
Figure 4 : Courbe de survie pour un microorganisme donné à une température donnée [4] 11
Figure 5 : Exemple de RABS ouvert actif [10] 19
Figure 6 : L'isolateur [10] 21
Figure 7 : La préparation de la solution 23
Figure 8 : Un tub contenant un nest portant des seringues [11] 24
Figure 9 : Plan d'installation du PNR [11] 25
Figure 10 : Le fonctionnement du bouchage [11] 26
Figure 11 : Le remplissage [11] 26
Figure 12 : Exemple de process allant de l'inspection visuelle au conditionnement [11] 28
Figure 13 : Exemples de tailles de contaminants fréquemment rencontrés [11] 32
Figure 14 : Coloration de Gram sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif [11] 34
Figure 15 : Structure d'une bactérie à Gram négatif 35
Figure 16 : Structure d'une bactérie à Gram positif 35
Figure 17 : Principales familles de bactéries [16] 35
Figure 18 : Aspect des moisissures (thalles filamenteux) [11] 36
Figure 19 : Aspect des levures (thalle levuriforme) [11] 37
Figure 20 : Structures des virus nus à gauche et enveloppés à droite 38
Figure 21 : Nombre de particules émises par une personne habillée d'une tenue standard de salle propre en fonction de son activité pour les particules ≥ 0,3 µm [9] 42
Figure 22 : Flore microbienne de l'Homme 43
Figure 23 : Interférence des sources et vecteurs de la contamination 44
Figure 24 : Composants d'un compteur particulaire [9] 46
Figure 25 : Evolution de la répartition des groupes de germes entre 2015 et 2016 [11] 52
Figure 26 : Principe de surpression [11] 57
Figure 27 : Exemple de locaux / flux à la fois classés et confinés [11] 57
Figure 28: Cinétique d'autodécontamination d'une ZAC [11] 59
Figure 29 : L'habillage en ZAC : Classe D, Classe C et Classe A/B [11] 60
Figure 30 : Logigramme du processus des déviations qualité [11] 75
Figure 31 : Logigramme du processus des CAPA [11] 77
Figure 32 : Point d'impact de l'héparine sur les principales étapes de la coagulation 78
Figure 33 : Boîte de Lovenox® 79
Figure 34 : Process global de production de Lovenox® [11] 79
Figure 35 : Détection de 3 seringues troubles à la lecture TRA [11] 80
Figure 36 : L'intervention contaminante 83
Figure 37 : Nourrice azote 84
Figure 38 : Cadence de remplissage 84
Figure 39 : Tendance environnementale pour R1 de la période du 10/2015 à 11/2016 [11] 87
Figure 40 : Tendance microbiologique du personnel depuis octobre 2015 à novembre 2016 [11] 88
Figure 41 : Tendance microbiologique de l'opérateur 1 89
Figure 42 : Tendance microbiologique de l'opérateur 2 89
Figure 43 : Recherche des causes probables par le diagramme d'Ishikawa [11] 95

Table des tableaux

Tableau 1 : Classe requise selon l'opération sur des préparations aseptiques 17
Tableau 2 : Concentration maximale autorisée de particules en suspension dans l'air [8] 17
Tableau 3 : Limites recommandées de contamination microbiologique [8] 17
Tableau 4 : Comportement des particules en fonction de leur taille 32
Tableau 5: Nombre de particules par m3 d'air (diamètre ≤ 0,5µm) selon l'environnement [15] 41
Tableau 6 : Norme Federal Standard 209E (Norme américaine) en particules/pied cube 53
Tableau 7: Norme Federal Standard 209E (Norme américaine) en particules/m^3 d'air 54
Tableau 8 : Norme ISO 14644-1 54
Tableau 9 : Classes particulaire selon Annexe 1 BPF [8] 55
Tableau 10 : Equivalence de classes [11] 55
Tableau 11: Classification des filtres HEPA 58
Tableau 12 : Nombre de particules de diamètre ≥ 0,3 µm émises / minute par une personne en fonction de l'habillage 61
Tableau 13 : Résumé du fonctionnement des ZAC 64
Tableau 14 : Revue du dossier de lot partie division du TRA 82
Tableau 15 : Déroulement de l'intervention changement de couple pompe / aiguille 83
Tableau 16 : Répartition des contaminations impliquant Kocuria spp sur R1 85
Tableau 17 : Répartition des contaminations impliquant Staphylococcus cohnii sur R1 85
Tableau 18 : Limites des taux de contamination pour le monitoring environnemental 87
Tableau 19 : Résumé du TRA 94

Bibliographie

[1] : Amadio, S. « Les technologies barrières : Coup double ! ». *La vague.* N°52. Janvier 2017. Page 5.

[2] : Article L.5111-1 du Code de la Santé Publique.

[3] : Langevin, C. *Department of Pharmacy CHAPITRE 3 ADME du Médicament*. [http://slideplayer.fr/slide/10455644/], consulté le 23/10/17.

[4] : Wouessi-Djewe, D. *Formes galéniques administrées par voies parentérales*. [http://unf3s.cerimes.fr/media/paces/Grenoble_1112/wouessi_djewe_denis/wouessi_djewe_denis_p06/wouessi_djewe_denis_p06.pdf], consulté le 23/10/17.

[5] : OMS. *Vaccination pratique*, 1999, [http://helid.digicollection.org/en/d/Js2673f/5.2.html] , consulté le 23/10/17.

[6] : Leem, *Pourquoi le conditionnement des médicaments est-il si important pour le patient ?*, 19/11/14, [http://www.leem.org/article/pourquoi-conditionnement-des-medicaments-est-il-si-important-pour-patient], consulté le 22/10/17.

[7] : CertoClav. *Méthodes de stérilisation physiques et chimiques*, [http://certoclav.com/de/support/knowledge/show/methodes-de-sterilisation-physiques-et-chimiques-1.htm], consulté le 30/10/17.

[8] : ANSM. *Bonnes Pratiques de Fabrication*, Ligne Directrice 1 : Fabrication de médicaments stériles. Pages 155 à 171. Bulletin officiel n°2016/12 bis.

[9] : GREPIC : Groupement Industries Pharmaceutiques Région Centre, *φ41,Pharmacotechnie industrielle,* IMT édition, 1998.

[10] : Sierakowski, D. « Répartition aseptique sous Isolateur ou open RABS ? ». *La vague* N°33. Février 2012. Cahier pratique pages 1 à 5.

[11] : Documents internes à Sanofi

[12] : Direction européenne de la qualité du médicament et soins de santé. *Pharmacopée européenne 8ème version.*

[13] : ANSM. *Bonnes Pratiques de Fabrication*, Partie I : Bonnes pratiques de fabrication des médicaments à usage humain. Chapitre 1 : Système qualité pharmaceutique. Pages 11 à 16. Bulletin officiel n°2016/12 bis.

[14] : ANSM. *Bonnes Pratiques de Fabrication*, Partie II : Bonnes pratiques de fabrication pour les substances actives utilisées comme matières premières dans les médicaments. Glossaire. Page 103. Bulletin officiel n°2016/12 bis.

[15] : Caillewaert, R. *La classification de propreté particulaire et la qualification des zones à atmosphères contrôlées : exemple d'un site de production de médicaments stériles injectables*.

[https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01232245/document], sous la direction de Philippe Vérité. Thèse de Pharmacie : Rouen : Université de Rouen, 2015, 77 pages, consulté le 22/10/17

[16] : Mme. Dhalluin, cours de 3ème année de pharmacie. Bactériologie. 2013

[17] : Hawksworth D.L. et al, « The fungal dimension of biodiversity : magnitude, significance, and conservation », *Mycological Research*, vol. 95, nº 6, 1991, pages 641–655.

[18] : Mme Sebire, cours section industrie de 4ème année. Circuit de distribution, 31/01/14

[19] : ANSM. *Bonnes Pratiques de Fabrication*, Partie I : Bonnes pratiques de fabrication des médicaments à usage humain. Chapitre 5 : Production. Pages 34 à 43. Bulletin officiel n°2016/12 bis.

[20] : AFNOR. NF EN ISO 14698 : Maîtrise de la biocontamination – Partie 1 : Principes généraux et méthodes (35 pages) – Partie 2 : Evaluation et Interprétation des données de biovalidation (11 pages), mars 2004.

[21] : Federal Standard 209E : Aiborne Particulate Cleanliness Classes In Cleanrooms and Clean Zones. September 11, 1992.

[22] : AFNOR. NF EN ISO 14644-1 : Salles propres et environnements maîtrisés apparentés – Partie 1 : Classification de la propreté de l'air, juillet 1999.

[23] : ANSM. *Bonnes Pratiques de Fabrication*, Partie I : Bonnes pratiques de fabrication des médicaments à usage humain. Chapitre 3 : Locaux et matériel. Pages 22 à 25. Bulletin officiel n°2016/12 bis.

[24] : Austin, Philip. Encyclopedia of Clean Rooms, Bio-Clean rooms and Aseptic Areas, 2000

[25] : ANSM. *Bonnes Pratiques de Fabrication*, Partie I : Bonnes pratiques de fabrication des médicaments à usage humain. Chapitre 2 : Personnel. Pages 17 à 21. Bulletin officiel n°2016/12 bis.

[26] : Le site de l'ultra-propreté, *Termes et définitions*, [http://www.ultraproprete.com/ultra-proprete/termes-et-definitions.html], consulté le 13/11/17

[27] : Pharmacorama. Médicaments anticoagulants par inhibition de l'activité de facteurs procoagulant, [https://www.pharmacorama.com/pharmacologie/medicaments-coagulation/medicaments-anticoagulants-inhibition-activite-facteurs-procoagulants/], consulté le 22/10/17.

[28] : U.S. Pharmacopeia. USP <1116> : Microbiological evaluation of clean rooms and other controlled environments. 2004.

VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE L'UFR

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.