Université de Bourgogne
UFR des Sciences de Santé
Circonscription Pharmacie

N° de thèse :

THÈSE

Présentée
à la Faculté de Pharmacie
de Dijon

pour l'obtention du Diplôme d'État
de Docteur en Pharmacie

soutenue publiquement le 04/11/2016

par

RENAUD Caroline

Née le 4 mars 1992 à Saint Rémy

VALIDATION DES MÉTHODES ANALYTIQUES : APPLICATION À UNE MÉTHODE DE DÉTERMINATION DE LA BIOCHARGE (*BIOBURDEN*) AVANT FILTRATION STÉRILISANTE ISSUE DE LA PHARMACOPÉE EUROPÉENNE

JURY : **M ANDRÈS (Président)**

M LEMAITRE (Directeur)

Mme PIERRE (juré)

M VERGNE (juré)

Liste du personnel enseignant

Université de Bourgogne
UFR des Sciences de Santé – Pharmacie

ANNÉE 2015/2016

Vice-Doyen de l'UFR des Sciences de Santé : M. Yves ARTUR

Professeurs	
ARTUR Yves	Biochimie générale et clinique
CHAMBIN Odile	Pharmacotechnie
GROS Claude	Chimie organique
HEYDEL Jean-Marie	Biochimie, biologie moléculaire
LACAILLE-DUBOIS Marie-Aleth	Pharmacognosie
LESNIEWSKA Éric	Biophysique
MARIE Christine	Physiologie
OFFER Anne-Claire	Pharmacognosie
TAN Kimny	Chimie thérapeutique
TESSIER Anne	Physiologie
VERGELY-VANDRIESSE Catherine	Physiopathologie, génétique
PU-PH	
KOHLI Évelyne	Immunologie, Virologie
GIRODON François	Hématologie
Professeurs Emérites	
ROCHETTE Luc	Physiologie
BELON Jean-Paul	Pharmacologie
Maîtres de Conférences	
ANDRÈS Cyrille	Pharmacotechnie
ASSIFAOUI Ali	Pharmacotechnie
BASSET Christelle	Immunologie, hématologie
BERARD Véronique	Pharmacotechnie
BETELLI Laetitia	Chimie analytique
BOUYER Florence	Pharmacologie
BOUYER Frédéric	Chimie physique, Chimie générale
CACHIA Claire	Biomathématiques
COLLIN Bertrand	Pharmaco-imagerie, radiopharmacie
DESBOIS Nicolas	Chimie organique
FAURE Philippe	Biochimie générale et clinique
GUELDRY Serge	Biologie cellulaire
LEMAITRE Jean-Paul	Bactériologie
NEIERS Fabrice	Biochimie, biologie moléculaire, enzymologie
ROCHELET Murielle	Chimie analytique
SEGUY Nathalie	Mycologie médicale, botanique
SEIGNEURIC Renaud	Biophysique
TABUTIAUX Agnès	Droit et Économie de la Santé
VIENNEY Fabienne	Biophysique
WENDREMAIRE Maëva	Toxicologie
MCU-PH	
BOULIN Mathieu	Pharmacie clinique
FAGNONI Philippe	Pharmacie clinique
LIRUSSI Frédéric	Toxicologie, toxicovigilance
SAUTOUR Marc	Biodiversité végétale et fongique
SCHMITT Antonin	Pharmacologie, Pharmacie clinique
PRCE	
ROUXEL Virginie	Anglais
AHU	
GOULARD DE CURRAIZE Claire	Bactériologie
CRANSAC Amélie	Pharmacie Clinique
PAST Officine	
MACE Florent	
MORVAN Laetitia	
Enseignants Contractuels Officine	
MICHIELS Yves	
SOLARI Marie-Alexandra	

Université de Bourgogne
UFR des Sciences de Santé
Circonscription Pharmacie

NOTE

La Faculté de Pharmacie de Dijon déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

REMERCIEMENTS

À Cyrille Andrès – *Maitre de conférences en pharmacotechnie – UFR des Sciences de Santé Circonscription Pharmacie, Dijon*

Merci d'avoir accepté de présider cette thèse. Merci également pour ta sympathie et pour les connaissances que tu m'as apportées en pharmacie galénique, tout au long des ces années d'étude, qui m'ont données l'envie de poursuivre dans la voie de la pharmacie industrielle.

À Jean-Paul Lemaître – *Maitre de conférences en bactériologie – UFR des Sciences de Santé Circonscription Pharmacie, Dijon*

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté d'être le Directeur de cette thèse et de m'avoir accompagnée dans la rédaction de ce travail. Merci pour la qualité de votre enseignement car c'est ce qui m'a orientée vers ce stage au laboratoire de contrôle qualité microbiologie.

À Laure Pierre – *Pharmacien représentant qualité – Lilly France, Fegersheim*

Laure, merci d'avoir accepté de juger ce travail. Merci pour les bons moments passés à SPPH et merci de m'avoir accompagnée au cours de mes premiers mois dans l'industrie pharmaceutique.

À Maxime Vergne – *Responsable microbiologie – Fareva, Romainville*

Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Merci pour le temps que tu m'as accordé tout au long de cette année et pour finir, merci de me donner l'opportunité de débuter ma carrière professionnelle au sein de ton service.

Aux enseignants de l'UFR des Sciences de Santé de Dijon

Merci de m'avoir formée pendant ces six années, me permettant ainsi de devenir Docteur en Pharmacie.

À mes collègues

Ceux de Fareva Romainville, et plus particulièrement le Laboratoire de Contrôle Qualité : merci pour votre sympathie et cette année riche en enseignements. Une pensée également pour les services validation/qualification et production du site SPPH.

À mes amis

Merci de m'avoir toujours donné le sourire et de m'avoir sorti le nez de mes bouquins quand c'était nécessaire. Et notamment, merci à ceux qui ont partagé les bancs de la faculté avec moi et sans qui toutes ces heures de cours, TP ou travaux de groupes n'auraient pas été aussi agréables.

À ma famille

Une page ne suffirait pas alors je vais simplement vous remercier d'avoir toujours été présents, de m'avoir soutenue, d'avoir eu confiance en moi (et de m'avoir supportée un peu aussi, surtout en période d'examens !). Vous voir fiers m'a toujours donné envie de faire mieux. Papa, Maman, Valentin, Mélanie : je vous aime !

À Justin

Déjà sept années à tes côtés, dont six en pharmacie pour moi, entre Chalon, Dijon, Cluny, Montréal, Paris, Gandia… Merci de m'avoir toujours donné le courage d'aller au bout de mes projets, merci de croire en moi, merci de ta patience (surtout) et de ton amour. Prêts pour de nouvelles aventures : je t'aime.

Université de Bourgogne
UFR des Sciences de Santé
Circonscription Pharmacie

SERMENT

Je jure, en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre, des Pharmaciens et de mes condisciples :

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

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

de ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIERES **7**

LISTE DES TABLEAUX **9**

LISTE DES FIGURES **10**

LISTE DES ABREVIATIONS **11**

INTRODUCTION **13**

PARTIE I : VALIDATION DES METHODES D'ANALYSE DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE **14**

I. GENERALITES SUR LA VALIDATION DES METHODES ANALYTIQUES 15

I.1. Définitions et rôles de la validation *15*

I.2. Types de validations *17*

I.3. Réglementation relative à la validation des méthodes analytiques *18*

II. DEMARCHE ET DOCUMENTATION POUR LA VALIDATION DES METHODES ANALYTIQUES 25

II.1. Cycle de vie des méthodes analytiques *25*

II.2. Organisation de la validation des méthodes analytiques *27*

II.3. Paramètres de performance des méthodes analytiques *30*

II.4. Documents de la validation des méthodes analytiques *34*

III. PREREQUIS A LA VALIDATION DES METHODES ANALYTIQUES 37

III.1. Qualification des instruments d'analyse *37*

III.2. Formation du personnel *40*

III.3. Validation des méthodes analytiques, un prérequis à la validation des procédés de fabrication et de nettoyage *41*

PARTIE II : CAS DE LA VALIDATION DES METHODES D'ANALYSE EN MICROBIOLOGIE **42**

I. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE : CONTEXTE ACTUEL ET ENJEUX 43

I.1. Limites des méthodes de référence *43*

I.2. Avantages des méthodes alternatives *44*

I.3. Obstacles à l'implantation des méthodes alternatives *45*

II. VALIDATION DES METHODES DE REFERENCE 46

II.1. Méthodes de référence utilisées dans l'industrie pharmaceutique *46*

II.2. Paramètres dont le laboratoire doit s'assurer pour la mise en œuvre des méthodes *52*

III. VALIDATION DES METHODES ALTERNATIVES 57

III.1. Principes des méthodes alternatives en microbiologie *57*

III.2. Comparaison des textes de la Pharmacopée européenne et de l'US Pharmacopeia pour la validation des méthodes alternatives en microbiologie *60*

PARTIE III : CAS PRATIQUE, VERIFICATION D'UNE METHODE DE DETERMINATION DE LA BIOCHARGE AVANT STERILISATION **70**

I. SUIVI DE LA BIOCHARGE D'UNE SOLUTION AVANT STERILISATION : ASPECTS THEORIQUES 71

I.1. Définitions de la stérilité et de la stérilisation *71*

I.2. Les différentes méthodes de stérilisation *72*

I.3. Suivi de la biocharge avant stérilisation *75*

II. CAS PRATIQUE : VALIDATION D'UNE METHODE DE DETERMINATION DE LA BIOCHARGE PAR FILTRATION SUR MEMBRANE AVANT FILTRATION STERILISANTE 79

II.1. Présentation du cas pratique *79*

II.2. Validation de la méthode de détermination de la biocharge..... 84

CONCLUSIONS..... 102

BIBLIOGRAPHIE..... 103

ANNEXE 1..... 109

ANNEXE 2..... 110

ANNEXE 3..... 113

ANNEXE 4..... 115

ANNEXE 5..... 125

ANNEXE 6..... 130

ANNEXE 7..... 134

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques de performance en fonction du type d'analyse, selon l'ICH Q2(R1) 27
Tableau 2 : Caractéristiques de performance en fonction du type d'analyse, selon le chapitre <1225> de l'USP 28
Tableau 3 : Rôles respectifs du fabricant et de l'utilisateur dans la QC, selon le chapitre <1058> de l'USP..... 38
Tableau 4 : Temps d'incubation nécessaire aux différents essais microbiologiques utilisés dans l'industrie pharmaceutique. D'après Shintani, 2016 (35). 44
Tableau 5 : Milieux utilisés pour la recherche de microorganismes spécifiés selon la Pharmacopée. 50
Tableau 6 : Microorganismes de référence utilisés pour la validation des méthodes issues de la Pharmacopée 54
Tableau 7 : Agents usuels de neutralisation des substances interférentes. 55
Tableau 8 : Paramètres de validation par type d'essai, selon la Ph. Eur. et selon l'USP 62
Tableau 9 : Options de démonstration de l'équivalence de deux méthodes, selon le chapitre <1223> de l'USP68
Tableau 10 : Comparaison des étapes pour la validation des méthodes alternatives en microbiologie, selon la Ph. Eur. et selon l'USP 69
Tableau 11 : Souches témoins en fonction du procédé de stérilisation utilisé. 75
Tableau 12 : Nombre d'essais à réaliser pour la validation de la méthode de détermination de la biocharge. 80
Tableau 13 : Plan des essais réalisés pour la validation de la méthode de détermination de la biocharge. 83
Tableau 14 : Microorganismes et conditions d'incubation pour vérifier la fertilité des milieux de culture. 85
Tableau 15 : Microorganismes et conditions d'incubation pour vérifier l'absence de propriétés inhibitrices du DNP 85
Tableau 16 : Références des microorganismes tests utilisés pour la validation de la méthode de détermination de la biocharge. 86
Tableau 17 : Limites microbiologiques recommandée d'une zone de classe A, selon les BPF. 87
Tableau 18 : Spécifications pour la qualité particulaire d'une zone de classe A, selon les BPF. 87
Tableau 19 : Conditions et proportions pour la réalisation des échantillons de produits. 89
Tableau 20 : Conditions d'incubation en fonction du microorganisme testé. 91
Tableau 21 : Résultats du dénombrement microbien sur les témoins négatifs et les témoins "produit". 99

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Étapes d'une procédure analytique ... 16
Figure 2 : Cycle de vie d'une méthode analytique ... 25
Figure 3 : Représentation schématique de l'exactitude et de la justesse ... 31
Figure 4 : Représentation schématique de l'exactitude et de la fidélité ... 32
Figure 5 : Triangle qualité des données analytiques, selon le chapitre <1058> de l'USP ... 37
Figure 6 : Méthode du Nombre le Plus Probable (NPP). ... 48
Figure 7 : Méthodes de stérilisation utilisées dans l'industrie pharmaceutique. ... 72
Figure 8 : Diagramme de stérilisation à la chaleur humide (autoclave). ... 73
Figure 9 : Prélèvement de l'échantillon pour la détermination de la biocharge avant filtration stérilisante… 79
Figure 10 : Représentation schématique du placement des sondes de suivi de la température lors de la cartographie d'une enceinte climatique. ... 88
Figure 11 : Essai de validation : filtration du produit et des souches. ... 91
Figure 12 : Témoins de validation : filtration du DNP des souches, en l'absence de produit. ... 92
Figure 13 : Témoins négatifs : filtration de DNP, ni produit, ni souche. ... 92
Figure 14 : Essais « produit » : filtration du produit, sans souche. ... 93
Figure 15 : Nombre moyen d'UFC pour la souche S. aureus ... 96
Figure 16 : Nombre moyen d'UFC pour la souche P. aeruginosa ... 96
Figure 17 : Nombre moyen d'UFC pour la souche B. subtilis ... 96
Figure 18 : Nombre moyen d'UFC pour la souche C. albicans ... 96
Figure 19 : Nombre moyen d'UFC pour la souche A. brasiliensis ... 96
Figure 20 : Facteur de recouvrement pour chaque souche et chaque essai. ... 97
Figure 21 : Témoins et essais de validation : S. aureus. ... 98
Figure 22 : Témoins et essais de validation : P. aeruginosa. ... 98
Figure 23 : Témoins et essais de validation : B. subtilis. ... 98
Figure 24 : Témoins et essais de validation : C. albicans. ... 98
Figure 25 : Témoins et essais de validation : A. brasiliensis. ... 98

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM : Agence Nationale de la Sécurité des Médicaments et autres produits de santé
API : *Active Pharmaceutical Ingredient* : Principe Actif Pharmaceutique
ATCC : *American Type Culture Collection* : Collection Américaine de Cultures Types
ATP : Adénosine Triphosphate
BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication
CE : Communauté Européenne
CFR : *Code of Federal Regulation* Code des Règlements Fédéraux
cGMP : *current Good Manufacturing Practices* : Bonnes Pratiques de Fabrication Américaines
CIP : Collection de Bactéries de l'Institut Pasteur
CPR : Centre de Production de Romainville
CTD : *Common Technical Document* : Document Technique Commun
CV : Coefficient de Variation
DEFT : *Direct Epifluorescent Filter Technique* : Technique de filtration et épifluorescence directe
DGAT : Dénombrement des Germes Aérobies Totaux
DMLT : Dénombrement des Moisissures et Levures Totales
DNP : Diluant Neutralisant Pharmacopée
EDQM : *European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare* : Direction Européenne de la Qualité du Médicament et des soins de santé
EMA : European Medicine Agency
E : Essai de Validation
FDA : *Food and Drug Administration*
FTIR : *Fourier Transform InfraRed spectroscopy* : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
ICH : *International Conference on Harmonisation* : Conférence Internationale d'Harmonisation
IMI : *International Mycologic Institute* : Institut International de Mycologie
IP : Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) Institut Pasteur
IPC : *In Process Control* : Contrôle en cours de procédé
ISO : *International Organization for Standardization* : Organisation internationale de normalisation
LD : Ligne Directrice
MALDI-TOF : *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation- Time-Of-Flight* : Source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol
MON : Mode Opératoire Normalisé ou *Standard Operating Procedure* (SOP)
NAS : Niveau d'Assurance de Stérilité
NBRC : *NITE Biological Resource Center* : Centre de Ressources Biologiques de l'Institut National de Technologie et d'Évaluation
NCIMB : *National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria* : Collection Nationale de Bactéries Industrielles, Alimentaires et Marines
NCTC : *National Collection of Type Cultures* : Collection Nationale de Cultures Types

NCPF : *National Collection of Pathogenic Fungis* : Collection Nationale de Champignons Pathogènes
NITE : *National Institute of Technology and Evaluation* : Institut National de Technologie et d'Évaluation
NPP : Méthode du Nombre le Plus Probable
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCR : *Polymerase Chain Reaction* : Réaction en chaîne par polymérase
PDV : Plan Directeur de Validation ou *Validation Master Plan* (VMP)
Ph. Eur. : Pharmacopée Européenne
PSM : Poste de Sécurité Microbiologique
PV : Protocole de Validation
QC : Qualification de Conception ou *Design Qualification* (DQ)
QI : Qualification d'Installation
QO : Qualification Opérationnelle
QOS : *Quality Overall Summary* : Résumé global de la qualité
QP : Qualification de Performance
RV : Rapport de Validation
SST : *System Suitability Tests* : Tests de conformité du système
TRA : Test de Remplissage Aseptique ou *Media Fill Test* (MFT)
TV : Témoin de Validation
UFC : Unité Formant Colonie
ULR : Unité de Lumière Relative
USP : *United States Pharmacopeia* : Pharmacopée Américaine
UV : Ultra-violet
V : Volume
ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée

INTRODUCTION

Le médicament est un produit de consommation particulier utilisé dans le but de prévenir ou traiter une maladie ou encore d'établir un diagnostic médical. Sa fabrication est donc encadrée et l'industrie pharmaceutique est tenue de se conformer à une réglementation stricte afin de garantir la **qualité**, la **sécurité** et l'**efficacité** des médicaments qui seront délivrés aux patients.

Le respect de ces exigences passe par la mise en place d'un système d'assurance de la qualité pharmaceutique et notamment par la validation des procédés et méthodes mis en œuvre lors de l'élaboration du médicament afin de s'assurer qu'ils sont parfaitement maîtrisés et conduiront de façon reproductible au résultat attendu.

La validation des méthodes analytiques est imposée par les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) mais au-delà de l'exigence réglementaire, cette étape est indispensable pour assurer la qualité, la fiabilité et la cohérence des résultats analytiques et ainsi statuer sur la conformité d'un produit.

Des recommandations telles que l'ICH Q2R(1) ou les *Guidelines* de la *Food and Drug Administration* (FDA) et de l'*European Medicine Agency* (EMA) orientent les industriels dans leur démarche pour la validation des méthodes mises en œuvre au sein de leurs laboratoires de contrôle qualité. Cependant, cela est surtout vrai pour les méthodes d'analyses physico-chimiques. En effet, concernant la validation des méthodes d'analyse en microbiologie, il existe peu de référentiels sur lesquels les entreprises peuvent s'appuyer. Les Pharmacopées précisent, dans leurs monographies, les essais à mettre en œuvre pour vérifier l'applicabilité des méthodes de référence ou les exigences générales pour la validation des méthodes alternatives, mais l'ensemble reste peu précis, plus particulièrement pour les méthodes en cours de développement.

Dans un premier temps, l'objectif de cette thèse est d'apporter une vision globale de la validation analytique dans l'industrie pharmaceutique, qu'il s'agisse de méthodes d'analyses physico-chimiques ou microbiologiques, en précisant quelles sont les exigences réglementaires, les démarches à suivre, la documentation à rédiger et les prérequis nécessaires.

Dans un second temps, la validation des méthodes microbiologiques sera abordée de façon plus détaillée que ce soit pour les méthodes de référence, décrites par les Pharmacopées ou pour les nouvelles méthodes, souvent plus rapides que les méthodes standard, appelées méthodes alternatives. Le but étant d'apporter des éléments clés pour la validation des méthodes d'analyse microbiologiques tout en précisant les enjeux relatifs aux méthodes alternatives et les difficultés rencontrées par les industriels lors de leur implantation.

Pour finir, cette thèse présentera l'exemple concret de la validation d'une méthode de référence destinée à déterminer la biocharge d'une solution de corticostéroïdes avant filtration stérilisante dans le cadre de la production d'un principe actif pharmaceutique stérile. Ce cas permettra d'illustrer les aspects théoriques présentés dans les précédents chapitres de cette thèse.

Partie I : Validation des méthodes d’analyse dans l’industrie pharmaceutique

I. Généralités sur la validation des méthodes analytiques

I.1. Définitions et rôles de la validation

I.1.1. Validation dans l'industrie pharmaceutique

Selon les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), la validation est « l'établissement de la **preuve** que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système **permet réellement d'atteindre les résultats escomptés** » (1).

La définition de la *Food and Drug Administration* (FDA) est proche puisqu'elle définit la validation comme « l'établissement de la **preuve documentée** qui prouve, avec un **haut degré d'assurance**, qu'un procédé spécifique **produira de façon constante un produit répondant aux spécifications et critères de qualité préalablement définis** » (2).

La validation est donc un **exercice documenté**, au cours duquel on veut démontrer que chaque étape d'un procédé se déroulera **comme prévu initialement**, et ce même dans des conditions extrêmes, et permettra de répondre à des **critères de qualité définis au préalable**.

Elle est appliquée à tout ce qui contribue directement ou indirectement à la fabrication du produit (3), c'est-à-dire (1) :

- aux procédés de production et de nettoyage
- aux systèmes informatisés
- aux équipements, dans ce cas, le terme qualification sera employé
- et également aux **méthodes d'analyse**

Pour les industries pharmaceutiques, la validation est tout d'abord une **exigence réglementaire**. Bien qu'il n'existe pas de description précise étape par étape, des *Guidelines* sont publiées par l'*European Medicine Agency* (EMA), la *Food and Drug Administration* (FDA), ou encore les Pharmacopées pour définir les responsabilités relatives à la validation (4).

Mais la validation est également un outil fondamental des entreprises, leur permettant d'avoir confiance dans la **qualité des produits fabriqués**. Par la maîtrise du procédé qu'elle apporte, la validation réduit la variabilité inter lots et minimise les effets liés au hasard. Cela assure l'obtention de produits de la même qualité, sûrs et efficaces et réduit les risques de rappels de lots ou de réclamations clients (4).

Enfin, bien que coûteuse au départ, la validation permet aux entreprises d'**optimiser les dépenses** en limitant les incidents en cours de production et les non-conformités lors des contrôles et donc en diminuant les coûts liés aux rejets, retraitements, retests ou investigations (4).

I.1.2. Validation des méthodes analytiques dans l'industrie pharmaceutique

Les laboratoires de contrôle qualité des industries pharmaceutiques sont tenus de mettre en œuvre de nombreux protocoles et méthodes d'analyse pour s'assurer de la qualité des médicaments du point de vue de la pureté, de l'efficacité, de la sécurité et de l'identité (5).

Les contrôles ne concernent pas l'intégralité de la production (5). Afin d'établir la conformité aux **spécifications préalablement définies** et aux **exigences réglementaires**, des échantillons sont prélevés puis une aliquote peut être réalisée si l'échantillon est trop important pour être analysé en totalité. La prise d'essai est ensuite préparée et la mesure effectuée pour obtenir des données qui seront analysées, voir Figure 1 (6).

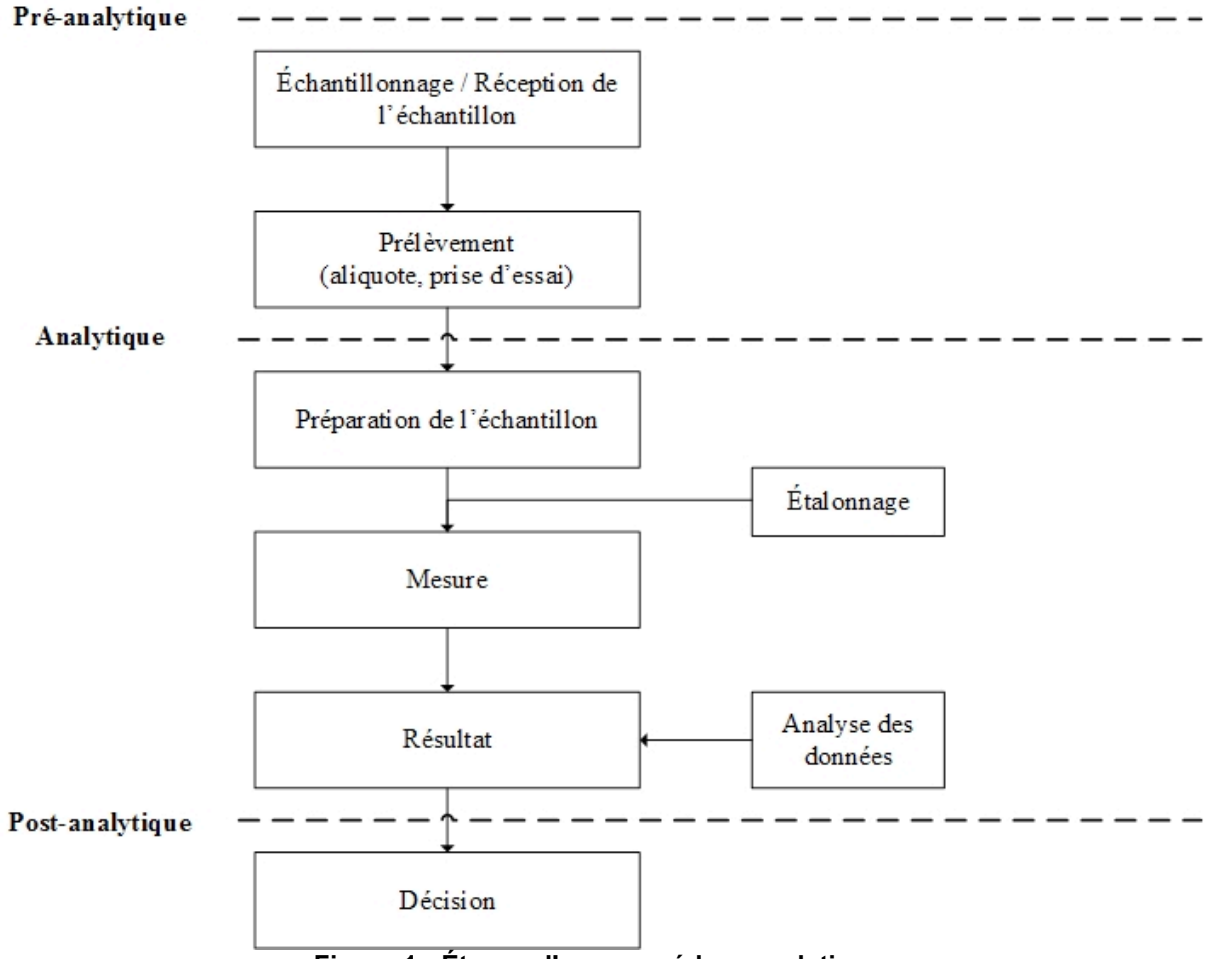


Figure 1 : Étapes d'une procédure analytique
Adapté de Max Feinberg, 2009 (6)

Les contrôles réalisés concernent également les **matières premières**, les **articles de conditionnement**, les **produits intermédiaires** et **vracs** (5). Le laboratoire contrôle l'**environnement** dans lequel le médicament est produit (air et surface) et les **eaux** de procédé. Pour finir, il participe à la **validation des procédés de nettoyage, de stérilisation et de fabrication** (notamment les Tests de Remplissage Aseptique : TRA ou *Media Fill Test* : MFT, nécessaires à la validation des procédés aseptiques)**,** par les analyses conduites lors de leur validation.

Le laboratoire doit avoir confiance dans les résultats des contrôles, car la sécurité du patient est en jeu. De plus, les analyses ont un coût, les échantillons peuvent être fragiles et difficiles à conserver ou les quantités disponibles trop limitées pour permettre de recommencer la manipulation (7). Pour finir, un résultat non conforme peut engager le rejet du lot ou un retraitement, un retest et des investigations. L'ensemble de ces actions représentent un coût élevé pour l'entreprise (4). Les méthodes employées pour ces contrôles doivent donc elles-mêmes être contrôlées pour s'assurer de la fiabilité, de la cohérence et de la précision des résultats obtenus : c'est la **validation des méthodes analytiques** (5).

Tout comme la fréquence et la nature des contrôles à réaliser, les exigences relatives à la validation des méthodes analytiques sont dictées par les autorités réglementaires (5).

I.2. Types de validations

I.2.1. Validation prospective

La validation prospective est la plus recommandée du point de vue réglementaire, c'est également l'approche privilégiée par les entreprises, car elle est plus sûre.

Elle repose sur les données recueillies d'après un protocole défini et se déroule au début d'un projet, avant l'utilisation en routine d'un procédé (1,8).

I.2.2. Validation concomitante ou simultanée

Exceptionnellement, lorsque la validation prospective n'est pas réalisable, on peut procéder à une validation simultanée. Ce choix de validation doit être justifié, documenté et approuvé par les personnes responsables.

Les données sont alors recueillies au cours de l'exécution réelle et répétée d'un procédé. Elles seront ensuite évaluées pour permettre la validation. Les exigences documentaires sont les mêmes que pour la validation prospective et un protocole définissant les informations à collecter doit être rédigé (1,8).

I.2.3. Validation rétrospective

Une validation rétrospective peut être réalisée sur un procédé, utilisé depuis longtemps et pour lequel la validation n'a jamais été réalisée. Elle permet alors une mise en conformité avec les exigences réglementaires. Une analyse rigoureuse des données expérimentales accumulées au cours des fabrications et contrôles précédents doit être faite.

Cependant, ce type de validation n'est valable que sur un système, un procédé ou un équipement qui n'a jamais été l'objet de modifications, même mineures. En l'absence d'une documentation précise sur les interventions pratiquées, on ne peut donc pas connaître avec certitude la période couverte par la validation rétrospective. En principe, et lorsque cela est possible, elle doit être évitée (1,8).

Pour les essais analytiques, une évaluation rétrospective des valeurs de nombreux essais peut être réalisée si les numéros de lot, les modifications éventuelles des paramètres du test, du matériel ou des techniciens ont bien été documentés. Si les informations sont disponibles, la validation rétrospective de l'essai peut être réalisée (8).

I.2.4. Revalidation

Une fois la validation réalisée, le système ou le procédé est considéré comme maîtrisé tant qu'aucune modification significative ne survient. C'est-à-dire qu'en cas de changement une revalidation devra être entreprise (8).

Dans le cas des méthodes analytiques, la revalidation permet de s'assurer que les critères de performance de la méthode sont toujours atteints (9). L'ICH Q2(R1) donne des exemples de situations dans lesquelles une revalidation peut être nécessaire pour une méthode analytique :

- en cas de changement dans la synthèse de la substance médicamenteuse
- en cas de modification de la composition du produit fini
- en cas de changement dans la procédure d'analyse

L'étendue de la revalidation dépendra de la nature du changement (10).

Une évaluation doit également être planifiée de façon périodique afin de s'assurer que les procédés restent maîtrisés et évaluer la nécessité, ou non, d'une revalidation (9).

Concernant les méthodes analytiques, le fabricant doit s'assurer que la méthode reste maîtrisée et adaptée à l'utilisation. Il peut être intéressant pour le fabricant de prendre en compte de nouvelles méthodes d'analyse qui peuvent apporter une plus grande assurance de la qualité du produit (9).

I.3. Réglementation relative à la validation des méthodes analytiques

I.3.1. Place dans l'Autorisation de Mise sur le Marché

Tous les médicaments mis sur le marché doivent faire l'objet d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) préalable.

En vue de l'harmonisation internationale des demandes d'AMM, le dossier doit être présenté selon un format standard élaboré par l'*International Conference on Harmonisation* (ICH) et appelé *Common Technical Document* (CTD) ou Document Technique Commun.

Le CTD est constitué de cinq modules, le premier est spécifique à la région où la demande est déposée tandis que les quatre autres sont communs (11) :

- **Module 1**

Ce premier module doit contenir des informations administratives et des informations relatives à la prescription.

- **Module 2**

C'est un résumé du CTD. Il commence par une présentation générale du médicament : sa classe pharmacologique, son mode d'action, son utilisation clinique. Ce module présente également un résumé global relatif à la qualité du produit (*Quality Overall Summary* ou QOS), une vue d'ensemble sur les données non cliniques et sur les données cliniques, et des résumés sur ces données.

- **Module 3**

Cette partie doit contenir des informations relatives à la qualité de la substance active d'une part et du produit fini d'autre part.

- **Module 4**

Ce module doit contenir le rapport des études non cliniques, c'est-à-dire les informations relatives à la pharmacologie, la pharmacocinétique et à la toxicité recueillies lors de l'utilisation du médicament chez l'animal.

- **Module 5**

Cette dernière partie présente le rapport des études cliniques, c'est-à-dire les informations recueillies lors de l'utilisation du médicament chez l'Homme. Il doit contenir des données relatives aux études biopharmaceutiques, pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, des données sur la sécurité et l'efficacité du médicament ainsi que des données de pharmacovigilance, obtenues après la mise sur le marché.

Dans le Module 3 du CTD, dans le cadre du contrôle des substances médicamenteuses (**3.2.S.4.2** et **3.2.S.4.3** du chapitre 3.2.S.4 *Control of Drug Substance*, partie 3.2.S *Drug Substance*) et du contrôle des produits finis (**3.2.P.4.2** et **3.2.P.4.3** du chapitre 3.2.P.4 *Control of Excipients* et **3.2.P.5.2** et **3.2.P.5.3** du chapitre 3.2.P.5 *Control of Drug Product* de la partie 3.2.P *Drug Product*), il est demandé de **fournir la méthode d'analyse employée ainsi que les informations relatives à la validation de ces méthodes**.

La validation des méthodes d'analyse est donc une exigence réglementaire pour la commercialisation d'un médicament.

I.3.2. Réglementation en France et en Europe

I.3.2.i. Bonnes Pratiques de Fabrication

En France et en Europe, la fabrication des médicaments et des substances actives est réalisée suivant des règles précises qui garantissent leur qualité : les *Good Manufacturing Practices* (GMP) ou Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) (12).

Ces règles sont éditées par la Commission Européenne dans le guide de bonnes pratiques de fabrication de médicaments à usage humain et vétérinaire puis transposées en France par l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et autres produits de santé (ANSM). La version actuelle du guide des bonnes pratiques de fabrication a été publiée au Bulletin Officiel Spécial du Ministère des Affaires sociales et de la Santé sous le n°2015/12 bis (12).

Les BPF sont articulées en trois parties (1) :

1. La première partie est constituée de neuf chapitres, elle présente les principes qui s'appliquent à la fabrication des médicaments.
2. La deuxième partie compte 19 chapitres, elle fait référence à la fabrication des substances actives utilisées comme matières premières dans la fabrication des médicaments.
3. La troisième partie présente un ensemble de documents relatifs aux BPF.

Ces trois parties sont complétées par 19 annexes ou Lignes Directrices particulières (LD).

Dans la **partie I** des BPF, il est mentionné dès le **chapitre 1 : Système qualité pharmaceutique**, que « les méthodes de contrôle sont validées ».

Cette notion revient dans le **chapitre 6 : Contrôle de la qualité**, qui précise d'une part que les méthodes d'analyse doivent être validées (**6.15**), mais que l'on doit également disposer des dossiers de validation des méthodes de contrôle (**6.7**).

Dans la **partie II** des BPF, **chapitre 12 : Validation** (12.74) et dans la **Ligne Directrice 15 Qualification et Validation** (37), il est écrit que dans le cadre de la validation du nettoyage, « des méthodes analytiques validées ayant la sensibilité nécessaire pour détecter les résidus ou les contaminants doivent être utilisées ».

Cependant, c'est dans la **partie II** basée sur l'ICH Q7, **chapitre 12 : Validation**, que l'on obtient le plus d'informations sur la validation des méthodes d'analyse :

12.8. Validation des méthodes analytiques

12.80 « Les méthodes analytiques doivent être validées à moins que la méthode utilisée ne soit incluse dans la Pharmacopée appropriée ou dans un autre standard de référence reconnu. La pertinence de toutes les méthodes d'analyse utilisées doit néanmoins être vérifiée dans les conditions réelles d'utilisation et être documentée. »

12.81 « Les méthodes doivent être validées en prenant en compte les critères inclus dans les guides ICH sur la validation des méthodes analytiques. Le degré de la validation analytique réalisée doit refléter le but de l'analyse et l'étape du procédé de production de la substance active. »

12.82 « La qualification appropriée des appareils d'analyse doit être prise en compte avant de débuter la validation des méthodes analytiques. »

12.83 « Les enregistrements complets de toute modification d'une méthode analytique validée doivent être conservés. De tels enregistrements doivent inclure la raison de la modification et les données appropriées pour vérifier que la modification donne des résultats aussi précis et fiables que la méthode établie. »

I.3.2.ii. Guidelines EMA

L'*European Medicine Agency* (EMA) ou Agence européenne du médicament est une agence de l'Union Européenne créée en 1995 et localisée à Londres. Cette

agence est responsable de l'évaluation des médicaments pour leur accès au marché européen *via* la procédure centralisée d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). Elle se charge également de surveiller les médicaments autorisés tout au long de leur cycle de vie afin de s'assurer que la balance bénéfices-risques reste positive (13).

Concernant la validation des méthodes d'analyse, l'EMA intègre la *Guideline* ICH Q2(R1), mais elle a également publié en 2011 une *Guideline* consacrée à la validation de méthodes bioanalytiques : ***Guideline on bioanalytical method validation***. Elle traite de la validation des méthodes destinées à mesurer la concentration de substances médicamenteuses dans les matrices biologiques telles que le sérum, le plasma, le sang, les urines, la salive au cours des essais précliniques et cliniques (14).

I.3.2.iii. Pharmacopée

La Pharmacopée est un référentiel opposable qui présente, sous forme de monographies les critères de pureté des matières premières ou des préparations entrant dans la fabrication des médicaments ainsi que les méthodes à utiliser pour assurer leur contrôle (15).

Elle comprend (15) :

- la Pharmacopée française, préparée et publiée par l'ANSM
- la Pharmacopée européenne, préparée et publiée par l'*European Directorate for the Quality of Medicines* (EDQM) ou Direction Européenne de la Qualité du Médicament et des soins de santé (DEQM)

Les méthodes décrites dans la Pharmacopée sont des méthodes de référence et sont considérées comme étant validées (16), cependant des indications sont données dans les différents chapitres relatifs aux méthodes pour que le laboratoire s'assure de son aptitude à les mettre en œuvre.

Concernant les méthodes alternatives en microbiologie, c'est-à-dire les méthodes ne figurant pas dans la Pharmacopée, le chapitre **5.1.6 Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique** décrit les exigences générales pour leur validation (17).

I.3.3. Réglementation aux États-Unis

I.3.3.i. cGMP: current Good Manufacturing Practices

Les cGMP pour *current Good Manufacturing Practices* sont les bonnes pratiques de fabrication en vigueur aux États-Unis. Elles sont inscrites dans le *Code of Federal Regulation (CFR) 21 part 211* et comme pour les Bonnes Pratiques de Fabrication françaises, la validation analytique apparaît comme une exigence réglementaire (2).

Trois points sont notamment abordés (2) :

- Les méthodes doivent être validées

211.165(e) : « L'exactitude, la sensibilité, la spécificité et la reproductibilité des méthodes de test utilisées par l'entreprise doivent être établies et documentées.»

- La validation des méthodes doit être tracée dans des rapports

211.194(a)(2) : « Les enregistrements du laboratoire devraient inclure une évaluation de chaque méthode utilisée pour tester les échantillons. L'évaluation devrait indiquer la localisation des données qui établissent que la méthode utilisée pour tester les échantillons répond aux standards d'exactitude et de fiabilité. L'aptitude de toutes les méthodes de test devrait être vérifiée selon les conditions d'utilisation réelles. »

- Les modifications apportées à la méthode doivent être enregistrées et justifiées

194(b) « Des enregistrements complets doivent être assurés pour toute modification d'une méthode établie employée dans les tests. Ces enregistrements devraient inclure les raisons de la modification et les données permettant de vérifier que cette modification donne des résultats au moins aussi précis et fiables que ceux obtenus avec la méthode établie. »

I.3.3.ii. Guidelines FDA

Afin d'accompagner les industriels, la *Food and Drug Administration (FDA)*, équivalent américain de l'ANSM, publie des séries de *Guidelines*. Certaines sont spécifiques à la validation analytique : ***Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics***.

Ce guide est destiné à aider les fabricants de médicaments à rassembler les informations et à présenter les données relatives à la validation de leurs méthodes d'analyse. Ces recommandations ne sont pas centrées sur les paramètres à vérifier lors de la validation de la méthode puisqu'elles viennent en complément de l'ICH Q2(R1). Elles traitent notamment du développement de la méthode, de la manière adéquate de décrire les procédures analytiques et du cycle de vie de la méthode : de sa revalidation, de la comparaison avec d'autres méthodes ou encore de son transfert (9).

Un autre guide, ***Bioanalytical Method Validation***, traite de la validation des méthodes destinées à déterminer la concentration d'un médicament ou d'un métabolite dans les matrices biologiques comme le sang, le sérum, le plasma, l'urine, les tissus ou la peau (18).

I.3.3.iii. U.S. Pharmacopeia (USP) : Pharmacopée américaine

Comme c'est le cas pour la Pharmacopée européenne, les monographies de l'USP constituent un référentiel opposable (19). Plusieurs textes font référence à la validation des méthodes :

- **<1225>** ***Validation of compendial procedures*** : ce texte décrit les paramètres à considérer pour la validation d'une nouvelle méthode et les informations à fournir pour son intégration à l'USP (20).

- **<1226>** ***Verification of compendial procedures*** : ce texte apporte des informations pour les laboratoires qui souhaitent mettre en place au sein de leur laboratoire des méthodes de référence ou des méthodes déjà validées au sein d'un autre laboratoire. Il ne couvre cependant pas la vérification des méthodes en microbiologie qui est abordée dans les chapitres généraux ***<51>***, ***<61>***, ***<62>***, ***<71>*** et ***<1227>*** (21).

Il existe également un chapitre spécifique pour la sélection, l'évaluation et l'utilisation de méthodes alternatives en microbiologie : ***<1223> Validation of alternative microbiological methods*** (22).

I.3.4. Harmonisation tripartite de la réglementation

L'ICH est l'*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* ou Comité International pour l'Harmonisation des Exigences Techniques pour les Médicaments à Usage Humain. Cette entité réunit les autorités réglementaires et les industries pharmaceutiques des **États-Unis**, du **Japon** et de **l'Union Européenne**. Leur but est de discuter des aspects techniques et scientifiques de l'enregistrement des médicaments au niveau mondial afin d'aboutir à un dossier harmonisé pour la mise sur le marché des médicaments.

La volonté d'harmonisation de la réglementation au sein de ces trois grandes régions a tout d'abord été motivée par la volonté d'apporter aux patients un médicament de **qualité**, **sûr** et **efficace**. En effet, après plusieurs tragédies liées aux médicaments, notamment en Europe dans les années 1960 avec la thalidomide, il est apparu nécessaire de renforcer la législation encadrant la commercialisation des médicaments (23).

De plus, face à un marché de plus en plus international les industriels ont rencontré des difficultés pour la commercialisation de leur médicament. Les différences réglementaires entre les pays les obligeaient à répéter certains essais, dont les essais cliniques par exemple, entraînant ainsi une augmentation des coûts et des délais. L'harmonisation de la réglementation a alors été vue comme le moyen de ralentir cette montée des coûts (23).

L'harmonisation a été initiée avec succès dans les années 1980 par la Communauté Européenne (EC) qui souhaitait développer un marché unique pour les produits pharmaceutiques. En parallèle, des discussions concernant l'harmonisation entre les États-Unis, le Japon et l'Europe (principales régions de développement de nouveaux

médicaments à ce moment-là) ont finalement abouti à la création de l'ICH en 1990 à Bruxelles (23).

L'ICH rassemble des groupes d'experts qui représentent les autorités réglementaires et les associations industrielles des trois régions initiatrices, mais également de la Suisse et du Canada ainsi que des observateurs comme l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (24). Ils émettent des *Guidelines* pour une meilleure compréhension des exigences relatives à la qualité, la sécurité et l'efficacité des médicaments et leur application. Ces *Guidelines* sont divisées en quatre grands thèmes (25) :

- **qualité**, qui aborde des étapes clés pour la qualité du médicament comme les études de stabilité, la validation analytique ou encore le management du risque qualité

- **sécurité**, relative à la toxicité des médicaments, entre autres : détection des effets cardiotoxiques, génotoxiques ou reprotoxiques …

- **efficacité**, qui traite les essais cliniques : conception, réalisation, sécurité lors des essais cliniques et établissement de rapports

- une partie **multidisciplinaire**, pour les thèmes transversaux comme le *Common Technical Document* (CTD) articulé en cinq modules qui permet l'harmonisation du dossier de demande d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) des médicaments

L'**ICH Q2(R1)** intitulée ***Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology*** (Validation des Procédures d'Analyse : Texte et Méthodologie) est entièrement consacrée à la validation des méthodes d'analyse. Elle est composée de deux parties. L'objectif de la première partie (ancienne Q2A) est de définir les critères à prendre en considération lors de la validation de la méthode. La seconde partie (ancienne ICH Q2B intégrée dans la *Guideline* parente en 2005) apporte des précisions sur la manière d'évaluer les performances de la méthode en fonction du type d'analyse : essais d'identification, dosage des impuretés ou essais de teneur (10) .

Comme cité précédemment, le chapitre 12.8 de l'**ICH Q7** ***Good Manufacturing Practices for Active Pharmaceutical Ingredients*** (Bonnes Pratiques de Fabrication des Principes Actifs Pharmaceutiques) est intégré dans les BPF partie II et spécifie les exigences relatives à la validation des méthodes (26).

II. Démarche et documentation pour la validation des méthodes analytiques

II.1. Cycle de vie des méthodes analytiques

Les méthodes d'analyse ne sont pas des procédés figés, elles sont sélectionnées, évoluent et peuvent par la suite être abandonnées et remplacées par une autre méthode. Afin de situer la place de la validation dans la vie d'une méthode, il est utile de présenter son cycle de vie, voir Figure 2 (6).

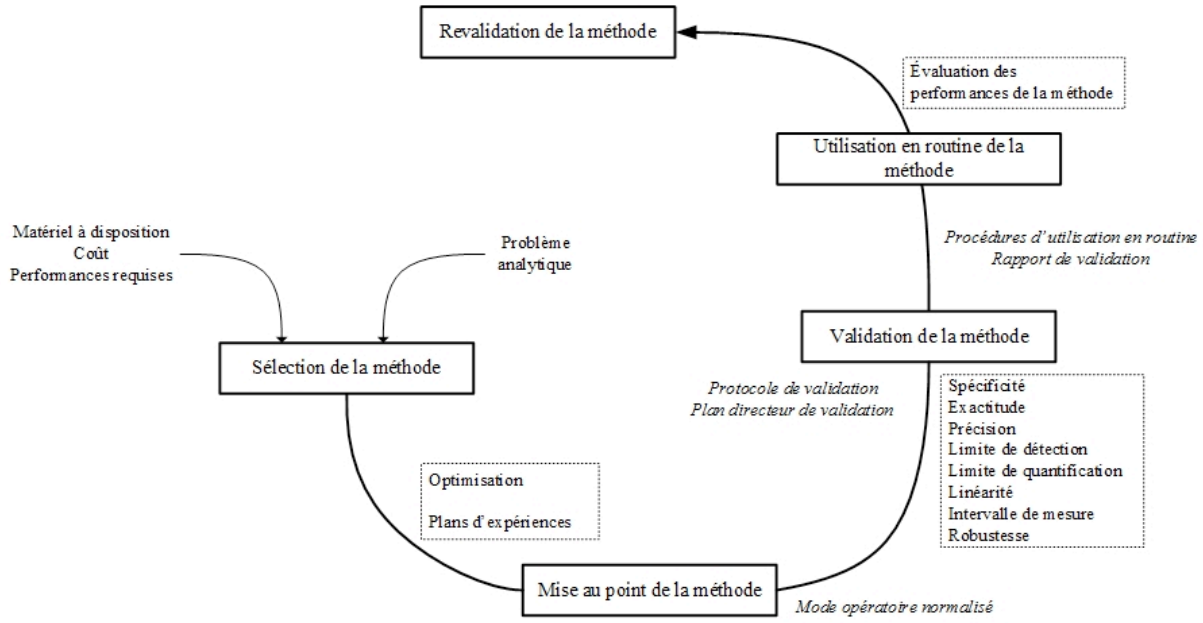


Figure 2 : Cycle de vie d'une méthode analytique
Adapté de Max Feinberg, 2009 (6)

II.1.1. Sélection de la méthode

La première étape consiste à sélectionner la méthode, c'est-à-dire, déterminer quelle est la méthode la plus appropriée pour répondre au problème analytique donné en tenant compte du matériel à disposition au laboratoire, des contraintes économiques et des performances requises. C'est donc le véritable point de départ de la validation de la méthode (6).

De préférence, le laboratoire doit choisir une méthode officielle, encore appelée méthode de référence ou méthode normalisée. C'est une méthode mise au point par des organismes compétents, par exemple, la Direction Européenne de la Qualité du Médicament et des soins de santé (DEQM) qui rédige les méthodes de la Pharmacopée européenne (27).

Le laboratoire peut également choisir de mettre en œuvre une autre méthode, développée en interne à partir de ses propres connaissances ou basée sur d'autres sources (27) :

- lorsqu'il n'existe pas de méthode normalisée ou qu'elle n'est pas adaptée
- afin de réduire les délais d'obtention des résultats

- afin d'assurer un contrôle à meilleur coût
- pour garantir une qualité accrue des produits pharmaceutiques

II.1.2. Mise au point de la méthode

Le développement permet d'adapter et d'optimiser la méthode en tenant compte des échantillons qui seront analysés et des conditions opératoires. L'analyste doit rechercher les conditions optimales pour la réalisation de l'essai et tenir compte des caractéristiques des produits à analyser, pour cela il peut réaliser un plan d'expériences pour une meilleure maîtrise des délais en évitant de gaspiller du temps en expériences aléatoires (6).

Cette étape aboutit à la rédaction d'un Mode Opératoire Normalisé (MON) ou *Standard Operating Procedure* (SOP) afin de formaliser la procédure ainsi mise au point (6).

II.1.3. Validation de la méthode

La validation permet de vérifier que la méthode est adaptée à ses objectifs (6). Pour cela, il faut « vérifier par des études expérimentales que les critères de performance de la méthode satisfont aux exigences prévues par les applications de la méthode »(6) .

Les méthodes normalisées sont considérées comme « valides » lorsqu'elles sont mises en œuvre selon les dispositions prévues dans la norme. Le laboratoire est uniquement tenu de démontrer son **aptitude à appliquer correctement les méthodes** et de s'assurer qu'elles sont **applicables à des substances médicamenteuses ou produits spécifiques**, cette validation peut être appelée **vérification**. Cependant, dans le cas où une méthode normalisée est utilisée hors du champ d'application de la norme, elle devra être entièrement validée (27).

Le laboratoire est tenu de valider les méthodes développées en interne (27).

II.1.4. Utilisation en routine de la méthode

Si la validation est conforme, la méthode peut être utilisée en routine au laboratoire (6).

Au cours de la vie de la méthode, il faudra s'assurer, par des vérifications appropriées, qu'elle **fonctionne toujours comme spécifié au départ**. En effet, le but de la validation n'est pas uniquement d'assurer l'obtention de résultats conformes lors de ses premières utilisations, mais tout au long de son utilisation par le laboratoire. Il n'est pas nécessaire de couvrir l'ensemble des tests initiaux, mais plutôt de se concentrer sur les paramètres critiques susceptibles de varier avec le temps et une **revalidation** est parfois nécessaire. Dans le cas où des changements, mêmes mineurs, sont apportés à la procédure analytique, il conviendra également de procéder à une revalidation plus ou moins complète selon la nature de la modification apportée (9).

Enfin, si la méthode est considérée comme obsolète, un nouveau cycle (voir Figure 2) sera démarré pour mettre en place une nouvelle méthode (6).

II.2. Organisation de la validation des méthodes analytiques

Le procédé de validation d'une méthode analytique peut être découpé en différentes phases.

Une fois la méthode sélectionnée, optimisée et formalisée il faut **définir les critères de validation** c'est-à-dire **déterminer les paramètres de performance et les critères d'acceptation**. Les paramètres de performances dépendront de l'usage attendu de la méthode. Il n'est pas nécessaire de valider tous les paramètres de performance, mais il faut savoir définir ceux qui doivent l'être (28). L'ICH Q2(R1) ou encore le chapitre *<1225>* de l'USP présentent des tableaux avec les critères à valider en fonction du type d'analyse, voir Tableau 1 (10) et Tableau 2 (20).

Tableau 1 : Caractéristiques de performance en fonction du type d'analyse, selon l'ICH Q2(R1)

Caractéristiques de performance *	Identification	Recherche d'impuretés		Dosage
		Essai quantitatif	Essai qualitatif	- Dissolution - Teneur ou activité
Exactitude	NON	OUI	NON	OUI
Précision	NON	OUI	NON	OUI
Répétabilité	NON	OUI	NON	OUI
Précision intermédiaire	NON	OUI	NON	OUI
Spécificité	OUI	OUI	OUI	OUI
Limite de détection	NON	NON	OUI	NON
Limite de quantification	NON	OUI	NON	NON
Linéarité	NON	OUI	NON	OUI
Intervalle de mesure	NON	OUI	NON	OUI

*Caractéristiques définies ci-après

Tableau 2 : Caractéristiques de performance en fonction du type d'analyse, selon le chapitre <1225> de l'USP

Caractéristiques de performance *[1]	Catégorie 1	Catégorie 2		Catégorie 3	Catégorie 4
		Essai quantitatif	Essai qualitatif		
Exactitude	OUI	OUI	*[2]	*[2]	NON
Précisions	OUI	OUI	NON	OUI	NON
Spécificité	OUI	OUI	OUI	*[2]	OUI
Limite de détection	NON	NON	OUI	*[2]	NON
Limite de quantification	NON	OUI	NON	*[2]	NON
Linéarité	OUI	OUI	NON	*[2]	NON
Intervalle de mesure	OUI	OUI	*[2]	*[2]	NON

*[1] Caractéristiques définies ci-après *[2] : Peut être requis selon la nature de l'essai

Catégorie 1 : Quantification des composants majeurs
Catégorie 2 : Recherche d'impuretés
Catégorie 3 : Détermination des caractéristiques de performance (dissolution, libération du médicament)
Catégorie 4 : Identification

Les critères d'acceptation dépendent également de l'usage attendu de la méthode et des spécifications réglementaires (tirées des *Guidelines* ICH ou de la Pharmacopée par exemple) et parfois des exigences du client, dans le cas de la sous-traitance industrielle, notamment. Ils pourront être réajustés si nécessaire lorsque le fabricant disposera de plus d'informations lors de la fabrication du produit (28). Il faut ensuite **définir les essais de validation**, c'est-à-dire quels tests seront réalisés pour évaluer ces critères, tous ces éléments doivent être réunis dans un **protocole de validation** (4).

L'étape suivante est l'**exécution des essais de validation** selon le protocole prédéfini. Dans un premier temps, il convient de préparer ces essais et donc de s'assurer d'avoir à disposition tous les réactifs et standards nécessaires, du matériel et des équipements qualifiés, du personnel formé et une documentation structurée sous forme de procédures. Les différentes *Guidelines* ne précisent pas l'ordre dans lequel les paramètres doivent être validés, la séquence optimale dépendra de la méthode elle-même. Les résultats obtenus sont ensuite comparés aux critères d'acceptation pour conclure sur la conformité de la validation. Il est également important de développer des essais qui permettront de s'assurer, lors des analyses de routine, que la méthode reste appropriée (28).

Une fois la méthode validée, un **rapport de validation** doit être rédigé. Ce rapport doit préciser les **critères de revalidation**, c'est-à-dire dans quelles conditions la méthode doit être revalidée (28).

Enfin, l'objectif de la validation des méthodes analytiques est leur utilisation en routine, des **procédures adaptées à l'utilisation en routine** et doivent donc être rédigées (28).

Cas de la validation des méthodes de référence

Dans les **Prescriptions Générales de la Pharmacopée Européenne**, il est écrit que « les essais et dosages décrits sont des méthodes officielles à partir desquelles sont établies les normes de la Pharmacopée européenne ». Ces méthodes « ont été validées selon les pratiques scientifiques d'usage et les recommandations usuelles sur la validation analytique » et « une validation de la méthode d'essai par l'analyste n'est pas nécessaire ». Cependant, « l'utilisateur doit évaluer si et dans quelle mesure il est nécessaire de démontrer l'applicabilité de la méthode dans les conditions réelles de mise en œuvre » (16).

Les cGMP précisent dans le ***21 CFR part 211.194 (a)(2)*** que « si la méthode employée figure dans la version actuelle de l'USP ou s'il s'agit d'une méthode normalisée reconnue et qu'elle n'est pas modifiée, une indication concernant la méthode et une référence suffiront. L'applicabilité de toutes les méthodes d'essai employées devrait être vérifiée dans les conditions réelles d'utilisation » (2).

Les exigences de la **norme ISO 17 025** sont proches puisque le **chapitre 5.4.2** spécifie que « le laboratoire doit confirmer qu'il peut correctement appliquer des méthodes normalisées avant de les mettre en œuvre pour des essais ou des étalonnages » (27).

Il apparaît donc clairement que les méthodes officielles n'ont pas à être validées si elles ne sont pas modifiées, cependant, le laboratoire doit démontrer que la méthode peut être utilisée de manière appropriée dans les conditions du laboratoire et sur une substance médicamenteuse ou un produit fini spécifiques.

Les recommandations clés données par le chapitre ***<1226> Verification of compendial procedures*** de l'*US Pharmacopeia* sont (21):

- évaluer la complexité de la méthode
- sélectionner les critères de performance appropriés à l'évaluation de la méthode
- vérifier l'applicabilité de la méthode

Le degré et l'étendue du processus de vérification dépendront de l'expérience de l'utilisateur, de la complexité de la procédure et des produits qui seront testés (21).

Tout comme la validation des méthodes développées en interne, la vérification des méthodes de référence est un processus documenté. Un protocole décrit les essais réalisés et les résultats sont consignés dans un rapport de validation.

Le processus de vérification comprend les étapes suivantes (28) :

1) Définir le champ d'application de l'essai qui doit être conduit au laboratoire
2) Le comparer au champ d'application de la méthode de référence
3) Si le champ d'application est différent, adapter la méthode ou développer une nouvelle méthode en interne

4) Si le champ d'application est identique, vérifier l'applicabilité de la méthode et évaluer les critères de performances appropriés
5) Si la méthode est conforme aux critères d'acceptation définis, rédiger la documentation pour la mise en application de la méthode au laboratoire (rapport, procédure)
6) Si les résultats ne sont pas conformes, rechercher la cause
7) Si le problème peut être corrigé, répéter les essais
8) Si le problème ne peut pas être identifié ou persiste, développer une nouvelle méthode

II.3. Paramètres de performance des méthodes analytiques

Les paramètres mentionnés dans l'ICH Q2R(1) sont définis ci-dessous.

II.3.1. Spécificité

L'ICH définit la spécificité comme « la capacité de la méthode à **doser sans équivoque un analyte en présence d'autres composants** que l'on s'attend à trouver dans la préparation » (10).

Autrement dit, la spécificité d'une méthode est son aptitude à faire la distinction entre ce que l'on recherche (par exemple, un principe actif) et des substances interférentes (par exemple, des impuretés liées au procédé de fabrication, des produits de dégradation du principe actif, la matrice) qui peuvent être présentes dans un mélange. Elle donne alors l'assurance que le signal mesuré correspond bien à l'analyte recherché (29).

II.3.2. Exactitude

L'exactitude correspond à « l'étroitesse de l'accord entre la valeur considérée comme vraie ou la valeur de référence et la valeur obtenue » (10).

L'exactitude d'une méthode doit être établie dans son intervalle de mesure. Elle s'exprime par le pourcentage d'erreur entre la valeur observée et la valeur réelle (8). C'est le reflet d'une **erreur systématique**, les résultats expérimentaux dévient toujours dans le même sens. Elle peut être due à des erreurs instrumentales (appareil déréglé, appareil non étalonné, appareil qui n'est pas utilisé dans les conditions appropriées), à la méthode, aux produits (contenant des impuretés) ou à des erreurs personnelles (manques de soin ou d'attention, personnel non qualifié). Si elles sont décelées suffisamment tôt, elles peuvent être évitées.

$$Erreur\ absolue = v_i - V_{réf}$$

$$Erreur\ relative = \frac{v_i - V_{réf}}{V_{réf}} \times 100$$

Avec v_i valeur obtenue lors de l'essai et $V_{réf}$ valeur considérée comme vraie ou de référence.

L'exactitude est liée à trois paramètres :

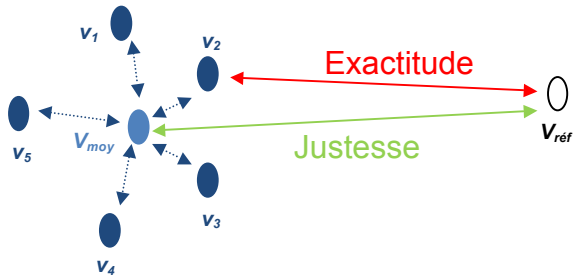
i. Les conditions opératoires
ii. La justesse
iii. La fidélité

II.3.2.i. Conditions opératoires

Il peut s'agir du mode opératoire, de l'étalonnage des appareils et instruments, de la température, de l'humidité, de la pression atmosphérique…

II.3.2.ii. Justesse

Elle est définie par la norme ISO 5725 comme «l'étroitesse d'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir de larges séries d'essais et une valeur de référence acceptée » (30), voir Figure 3.



$V_{réf}$	Valeur de référence
V_{moy}	Valeur moyenne des mesures répétées effectuées
v_1, v_2, v_3, v_4, v_5	Valeurs mesurées répétées

Figure 3 : Représentation schématique de l'exactitude et de la justesse

Elle est le reflet d'une **erreur systématique**.

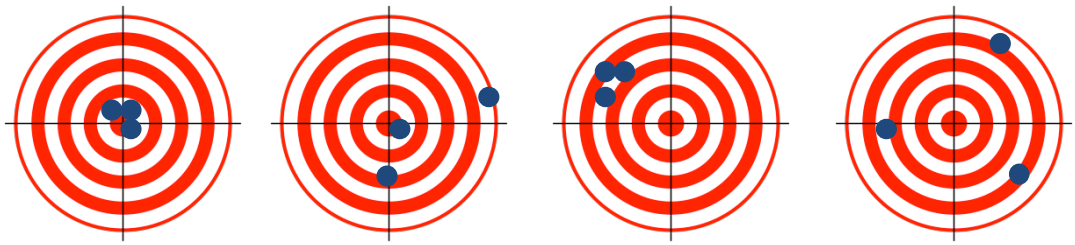
$$Erreur\ absolue = v_{moy} - V_{réf}$$

$$Erreur\ relative = \frac{v_{moy} - V_{réf}}{V_{réf}} \times 100$$

Avec v_{moy} : valeur moyenne obtenue à partir de plusieurs mesures et $V_{réf}$: valeur considérée comme vraie ou valeur de référence

II.3.2.iii. Précision ou fidélité

La Figure 4 représente schématiquement les notions d'exactitude et de fidélité.



Méthode exacte et fidèle | Méthode exacte non fidèle | Méthode non exacte fidèle | Méthode non exacte non fidèle

Figure 4 : Représentation schématique de l'exactitude et de la fidélité

II.3.3. Précision ou fidélité

La précision ou fidélité correspond à « l'étroitesse de l'accord entre les valeurs obtenues lors de la répétition d'une mesure, et ce dans des conditions spécifiées » (10).

La précision est déterminée par la répétition de la procédure d'analyse sur un nombre suffisant d'aliquotes d'un même échantillon afin de calculer le coefficient de variation (CV) exprimé en pourcentage (10).

$$Variance = \sum \frac{(v_i - V_{moy})^2}{n-1} \qquad \text{Avec} \qquad V_{moy} = \sum \frac{v_i}{n}$$

$$Ecart\ type\ \sigma\ ou\ s = \sqrt{Variance}$$

$$Coefficient\ de\ variation\ CV = \frac{Ecart\ type}{V_{moy}} \times 100$$

Avec v_i : valeur obtenue, V_{moy} : valeur moyenne obtenue et n : nombre de résultats obtenus.

On calcule une **erreur aléatoire**, les résultats expérimentaux se dispersent au-delà ou au-deçà de la valeur de référence. Ces erreurs par excès ou par défaut se produisent accidentellement et sont inévitables.

On distingue trois niveaux de précisions :

i. La répétabilité
ii. La reproductibilité
iii. La précision intermédiaire

II.3.3.i. Répétabilité

Elle traduit la fidélité des mesures sous un ensemble de conditions opératoires identiques et sur un intervalle de temps court. Elle est déterminée sur un même échantillon, dans le même laboratoire, par le même analyste, avec les mêmes équipements (10).

II.3.3.ii. Reproductibilité

Elle exprime la variabilité **interlaboratoire**. Les lieux, opérateurs et équipements sont différents. Les mesures sont réalisées sur un intervalle de temps long. Les mesures sont réalisées sur le même échantillon (10).

II.3.3.iii. Précision intermédiaire

Elle exprime la variabilité **intralaboratoire**. Les mesures sont réalisées sur le même échantillon, au sein du même laboratoire, mais les jours, les analystes et les équipements sont différents (10).

II.3.4. Limite de détection

La limite de détection est « la plus faible quantité de substance à analyser que la méthode peut détecter, sans fournir nécessairement la valeur exacte » (10).

Il s'agit de la plus basse valeur associée à un composé pour laquelle on va avoir un signal statistiquement différent de celui produit par le blanc, dans les mêmes conditions.

II.3.5. Limite de quantification

La limite de dosage est « la plus faible quantité de substance à analyser que la méthode peut doser avec un degré acceptable d'exactitude et de précision » (10).

II.3.6. Linéarité

La linéarité est « la capacité d'une méthode à donner des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans l'échantillon ». Elle est établie sur l'intervalle de mesure (10).

II.3.7. Domaine d'utilisation ou intervalle de mesure

Le domaine d'utilisation est « l'intervalle entre la concentration la plus faible et la concentration la plus élevée de la substance analysée dont on a démontré qu'elles pourraient être déterminées avec un degré acceptable d'exactitude, de précision et de linéarité » (10). On parle aussi d'intervalle de mesure.

II.3.8. Robustesse

La robustesse d'une méthode est sa « capacité à supporter sans conséquence de petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode » (10).

La robustesse donne une indication de la fiabilité de l'analyse dans les conditions normales d'utilisation (8).

Dans le cas où les conditions expérimentales ont une influence sur les résultats de l'analyse, cela devra être précisé afin qu'elles puissent être maîtrisées et que le test soit réalisé de façon appropriée (10).

Quelques exemples de paramètres qu'il est possible de faire varier : température d'incubation, durée d'incubation, humidité relative…

II.4. Documents de la validation des méthodes analytiques

II.4.1. Plan Directeur de Validation

La validation des méthodes d'analyse, tout comme les autres activités de validation, doit être planifiée (1). Elles sont donc inscrites dans le Plan Directeur de Validation (PDV), encore appelé *Validation Master Plan* (VMP). Ce document approuvé par la direction de l'entreprise couvre l'ensemble du site et décrit les systèmes, équipements, procédés et méthodes à valider et à quel moment cela doit être fait (8).

Le PDV donne une vision d'ensemble de toutes les activités de validation devant être réalisées et permet (31) :

- pour la **direction** : d'évaluer les ressources nécessaires en temps, personnel et coût
- pour le **personnel** chargé de la validation : de savoir quelles sont les tâches que les personnes doivent accomplir et quelles sont leurs responsabilités
- pour les **inspecteurs** : de comprendre l'approche générale du site concernant la validation et sa stratégie pour répondre aux exigences réglementaires

Selon les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), le PDV doit au minimum fournir des informations concernant (1,31) :

- la **politique de validation**

L'introduction peut également fournir une description générale de l'étendue des activités couvertes par le PDV, la localisation et le calendrier.

- la **structure organisationnelle** des activités de validation

Le PDV décrit quelles sont les responsabilités en matière de rédaction de la documentation de validation (PDV, protocoles, rapports), de réalisation des essais de validation et d'approbation des validations.

- le **relevé des installations, systèmes, équipements et procédés** à valider

Le PDV précise l'étendue de la validation, l'approche : validation prospective, simultanée, rétrospective ou revalidation, le statut actuel et à quel moment faire la revalidation et pour quelles raisons.

- le **format de la documentation** à utiliser

Le PDV fournit des modèles pour chaque document de validation (protocole, fiches de test, rapport) et le détail des informations devant être rapportées dans les documents.

- la **planification** et la **programmation**

Le PDV prévoit et justifie l'ordre des validations. Le PDV doit également prendre en compte les besoins nécessaires en termes de personnel, équipements et autres besoins spécifiques pour mener à bien les activités de validation.

- la **maîtrise des changements**

Le PDV spécifie les mesures à prendre au sein de l'entreprise pour contrôler les changements critiques concernant les équipements, installations, systèmes, procédés ou méthodes d'analyse.

- les **références aux documents existants**

En plus du PDV annuel du site, il est possible de rédiger un Plan Directeur spécifique plus précis pour un service, production ou contrôle qualité par exemple, ou un type d'activité, comme la validation des nettoyages.

II.4.2. Protocole de Validation

La validation des méthodes d'analyse, comme les autres activités de validation, doit suivre un protocole décrivant la démarche qui va être mise en œuvre (1).

Le protocole de validation présente (1) :

- l'**objet du document**, c'est-à-dire, que veut-on démontrer avec cette étude
- le **domaine d'application**, c'est-à-dire, quel équipement, procédé, système ou méthode veut-on valider
- les **documents** associés, il peut s'agir de références réglementaires ou de documents internes
- les **responsabilités** concernant la rédaction du protocole, du rapport, des fiches de test, la réalisation des essais de validation, l'approbation et la supervision du projet
- une **description** de l'équipement, du procédé, du système ou de la méthode faisant l'objet de la validation
- la **procédure de test**, avec les étapes critiques et les critères d'acceptation
- la **gestion des anomalies** en cas de déviations par rapport aux critères définis dans le protocole
- la **gestion des changements**
- des **instructions pour la rédaction du rapport de validation et la revalidation**

II.4.3. Rapport de Validation

La validation des méthodes d'analyse, comme les autres activités de validation doit être conclue par un rapport de validation (1).

Ce rapport doit faire référence au protocole de validation en rappelant (1) :

- les objectifs
- le domaine d'application
- les documents associés
- les responsabilités
- la description de l'équipement, procédé, système ou méthode ayant fait l'objet de la validation

- la procédure de test et les critères d'acceptation

Il doit surtout présenter de façon synthétique les résultats obtenus lors de l'étude de validation et les interpréter (1).

Si des écarts par rapport au protocole initial ont été observés, ils doivent être commentés et aboutir à des recommandations pour remédier au problème et fournir des pistes d'améliorations (1).

Pour finir, le rapport doit statuer sur la conformité de la validation (1).

III. Prérequis à la validation des méthodes analytiques

III.1. Qualification des instruments d'analyse

La qualification des instruments d'analyse, qui démontre que l'appareil est adapté à l'usage attendu, qu'il fait l'objet d'une maintenance et d'un étalonnage approprié, est un prérequis essentiel à la validation des méthodes analytiques (32).

Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) stipulent qu'une « qualification appropriée des appareils d'analyse doit être prise en compte avant de débuter la validation des méthodes analytiques. » (Partie II, Chapitre 12 VALIDATION, point 12.82) (1).

Un chapitre de l'USP est quant à lui totalement consacré à la qualité des données de laboratoire : ***<1058> Analytical instrument qualification*** (33). Selon ce chapitre, quatre activités permettent l'obtention de résultats fiables et cohérents. La qualification des instruments d'analyse et la validation du système informatique associé constituent la base de ce « triangle de qualité ». Les autres éléments garants de la qualité des données sont la validation des méthodes d'analyse, les *System Suitability Tests* (SST) ou tests de conformité du système et le *Quality Control check samples* ou analyse d'échantillons de contrôle qualité, voir Figure 5 (33). Ces tests permettent de s'assurer que les performances de la méthode sont maintenues lors de l'utilisation en routine (32).

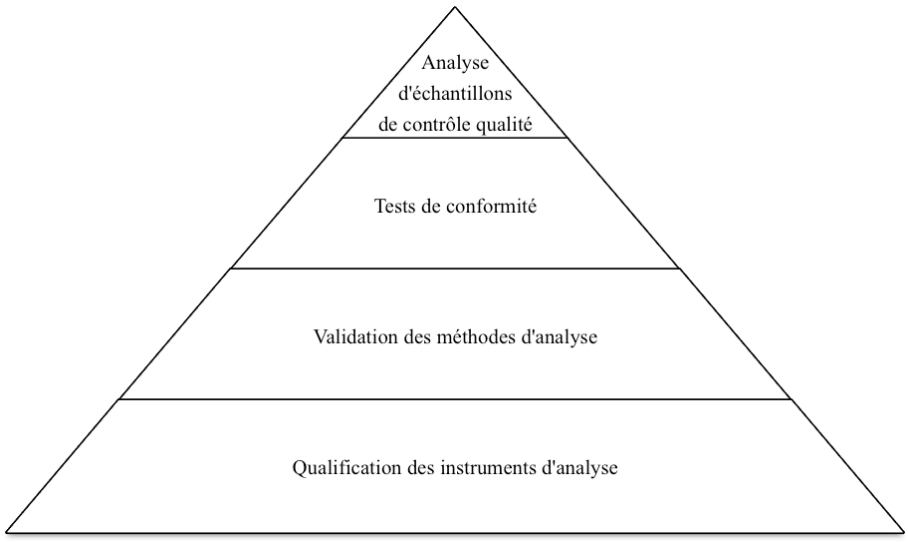


Figure 5 : Triangle qualité des données analytiques, selon le chapitre <1058> de l'USP

Classiquement, la qualification est divisée en quatre étapes :

1. La Qualification de Conception ou QC
2. La Qualification d'Installation ou QI
3. La Qualification Opérationnelle ou QO
4. La Qualification de Performance ou QP

III.1.1. Qualification de Conception (QC) ou Design Qualification (QD)

La Qualification de Conception est l'étape initiale de validation, elle se déroule au stade de projet, avant l'achat.

Elle consiste à définir, en fonction de l'usage attendu de l'équipement (33) :

- les spécifications opérationnelles (caractéristiques clés de l'équipement, intervalle d'utilisation) et fonctionnelles (exigences d'ensemble et facteurs liés à son usage comme la formation des utilisateurs, la maintenance, l'étalonnage, la documentation, la durée de la garantie)
- et les critères de sélection du vendeur

Le fabricant et l'utilisateur jouent tous deux un rôle dans la qualification de conception, voir Tableau 3.

Tableau 3 : Rôles respectifs du fabricant et de l'utilisateur dans la QC, selon le chapitre <1058> de l'USP

Fabricant	Utilisateur
Concevoir l'équipement Mettre en place un système pour assurer la qualité de l'équipement : garder les informations relatives à la fabrication de l'équipement, tester l'équipement	S'assurer que l'équipement répond à l'usage attendu S'assurer de l'existence d'un système pour assurer la qualité de l'équipement Déterminer les capacités du fabricant en termes d'aide à l'installation, de formation et de service après-vente

III.1.2. Qualification d'Installation (QI)

Elle s'applique aux équipements neufs, les équipements déjà utilisés et n'ayant jamais été qualifiés, les équipements déplacés ou ayant subi des modifications (1,33).

Elle se déroule au moment de l'installation, il s'agit de s'assurer que l'équipement (32) :

- est conforme à la demande du client
- n'a pas été endommagé lors du transport
- est accompagné d'une documentation technique (manuel d'utilisation, dessin technique) et réglementaire (certificat de conformité CE)
- a été installé en accord avec les recommandations du fabricant et dans un environnement approprié à son utilisation
- s'allume correctement
- et que les logiciels et autres composants du système communiquent entre eux de façon satisfaisante

La QI peut être réalisée par le fabricant/le vendeur, c'est souvent le cas pour les équipements complexes ou les balances, ou directement par l'utilisateur, ce qui est souvent le cas pour du petit matériel peu coûteux (32).

Lors de l'installation, l'équipement doit être identifié par une étiquette avec un numéro d'identification propre au laboratoire (32). Pour chaque équipement, une fiche est réalisée, elle comporte notamment la description de l'équipement avec le nom du fabricant, le modèle, le numéro de série, la version du logiciel et la localisation (33).

III.1.3. Qualification Opérationnelle (QO)

Cette étape fait suite à une QI réussie, elle permet de démontrer que l'instrument fonctionne selon ses spécifications opérationnelles, dans l'environnement sélectionné et que le système informatique et les sécurités fonctionnent (32).

Les tests de QO sont généralement établis à partir des informations fournies par le fabricant. L'utilisateur réalise ensuite les tests pour s'assurer que l'instrument répond aux spécifications définies par le fabricant ou l'utilisateur lui-même. Les fonctions et l'intervalle testés dépendent de l'usage attendu de l'instrument. Lorsque l'instrument est constitué de plusieurs modules, les tests peuvent être modulaires (concerner un seul module) ou holistiques (globaux). L'avantage des tests modulaires est qu'ils facilitent le remplacement d'un module par un autre, car cela ne nécessitera pas la requalification de l'intégralité du système (33).

Il n'est pas obligatoire de répéter les tests de QO à intervalle régulier, cependant, si l'instrument est déplacé ou s'il fait l'objet de modifications ou de réparations majeures, ces tests devraient être répétés pour s'assurer que les paramètres restent dans les spécifications (33).

III.1.4. Qualification de Performance (QP)

Cette étape se déroule une fois les étapes de Qualification d'Installation et de Qualification Opérationnelle complétées. C'est la preuve que l'instrument continue à fonctionner régulièrement selon les spécifications définies et qu'il est approprié à son usage de routine et à son environnement (32).

Les essais mis en œuvre dérivent de ceux réalisés lors de la QO et reflètent l'utilisation de routine de l'appareil. Les spécifications peuvent être différentes de celles de la QO. Comme les tests de QO, ils peuvent être modulaires ou holistiques (33).

La fréquence des tests dépendra de la robustesse de l'appareil et de la criticité des tests réalisés. Les tests peuvent être planifiés à intervalles réguliers ou réalisés à chaque fois que l'appareil est utilisé, cela dépendra de l'expérience dont le laboratoire dispose par rapport à cet appareil (33).

La QP peut également être partiellement couverte par les tests de conformité du système ou l'analyse d'échantillons de contrôle qualité (33). Les tests de conformité du système ou *System Suitability Tests* (SST) démontrent qu'au moment où l'analyse

est réalisée, le système est conforme aux critères définis dans la procédure et fonctionne toujours comme prévu. L'analyse d'échantillons de contrôle qualité ou *Quality control check samples* est faite sur des échantillons de matériaux de référence certifiés ou sur des échantillons préparés avec une quantité connue d'analyte. Ces échantillons sont répartis parmi les échantillons à analyser et permettent de s'assurer que la totalité du protocole d'analyse continue à fonctionner correctement (32).

Il est important que l'équipement fasse régulièrement l'objet d'une **maintenance**, d'un **étalonnage** et de **vérifications** (33).

III.1.5. Change Control

Si une modification est apportée au système, l'impact de changement doit être évalué afin de déterminer si une requalification est nécessaire. Le processus de *« change control »* suit les quatre étapes : QC, QI, QO et QP. Lors de la QC, il faut déterminer si le changement est nécessaire. Si oui, il doit être mis en place lors de la QI. Il faut ensuite évaluer si les tests de QO et QP doivent être modifiés puis les réaliser (33).

III.2. Formation du personnel

La qualification et la formation du personnel sont des facteurs cruciaux contribuant à la qualité du médicament (4).

Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) en font une exigence fondamentale et le chapitre 2 de la partie I et le chapitre 3 de la partie II sont d'ailleurs consacrés au personnel. Des précisions sont apportées sur la formation, il ressort de ces différents points que (1) :

- le personnel doit recevoir une formation de base sur le système de gestion de la qualité, les BPF et les règles d'hygiène
- le personnel doit, en plus de la formation générale, recevoir une formation adaptée à la tâche qu'il va effectuer
- les formations doivent être réalisées par du personnel qualifié
- la formation continue doit également être assurée
- l'efficacité des formations doit être évaluée
- les formations doivent être réalisées selon un programme approuvé
- un enregistrement de la formation doit être conservé

Dans les cGMP, une sous-partie B est également dédiée au personnel et à sa qualification (point 211.25). Les notions présentées sont proches de celle des BPF (2).

Bien qu'il ne soit pas précisément spécifié que la validation des méthodes d'analyse doit être réalisée par une personne qualifiée et formée, ces critères apparaissent comme une évidence pour une fois de plus, obtenir des résultats fiables. `

III.3. Validation des méthodes analytiques, un prérequis à la validation des procédés de fabrication et de nettoyage

La validation des méthodes analytiques requiert la qualification des instruments d'analyse et la formation du personnel, mais elle est, elle-même, un prérequis à la validation des procédés.

En effet, au cours des différentes étapes de la validation, des prélèvements vont être réalisés puis des analyses vont être effectuées pour s'assurer du bon déroulement du procédé.

Dans le cas de la validation des procédés de fabrication, les contrôles seront principalement effectués sur des produits intermédiaires ou sur les produits finis. Pour une validation de nettoyage, les contrôles seront réalisés sur les prélèvements effectués : essuyage, écouvillonnage, contacts directs ou eaux de rinçage. La Ligne Directrice 15 des BPF précise bien que « des méthodes d'analyse validées et de sensibilité appropriée doivent être employées pour détecter les résidus ou les contaminants » tout comme le ***Guide to inspections validation of cleaning processes*** de la FDA qui indique que « les méthodes analytiques mises en œuvre pour détecter les résidus ou les contaminants dont la spécificité et la sensibilité doivent être adaptées » (1).

Une méthode validée assure l'obtention de données analytiques de qualité permettant de prendre une décision éclairée concernant la conformité des procédés.

Partie II : Cas de la validation des méthodes d'analyse en microbiologie

I. Analyses microbiologiques dans l'industrie pharmaceutique : contexte actuel et enjeux

Les analyses microbiologiques réalisées dans le cadre de la production pharmaceutique peuvent être classées en trois grandes catégories (17) :

- les **essais qualitatifs** de présence/absence de microorganismes, permettant de détecter la présence de microorganismes par le développement d'une turbidité ou de toute autre modification liée à la croissance microbienne dans le milieu de culture
- les **essais quantitatifs** de dénombrement microbien, la filtration sur membrane, le dénombrement sur plaque ou encore la méthode du nombre le plus probable (NPP) sont des méthodes qui permettent d'estimer le nombre de microorganismes viables
- les **essais d'identification** des microorganismes par caractérisation biochimique et morphologique

Ils portent sur les matières premières, les articles de conditionnement, les produits intermédiaires, les produits finis, mais aussi l'environnement. Ils servent à assurer la qualité des médicaments, leur efficacité et leur sécurité. En effet, les contaminations bactériennes peuvent entraîner un risque pour le patient et/ou impacter la stabilité des médicaments (34).

I.1. Limites des méthodes de référence

Les méthodes de référence décrites par les Pharmacopées se basent la plupart du temps sur la **croissance dans un milieu de culture** pour la détection, le dénombrement ou l'isolement de microorganismes. Ces méthodes sont des outils précieux, toujours utilisées par les analystes, car elles présentent l'avantage d'être relativement **simples** à mettre en œuvre, **efficaces**, **peu coûteuses**, et **adaptées à tous les laboratoires de microbiologie** (17,35).

Elles présentent cependant certaines limites. Tout d'abord, ces méthodes sont **lentes**. En effet, les méthodes basées sur la croissance impliquent un temps d'incubation pouvant aller de trois à 28 jours, rendant le délai d'obtention des résultats plus ou moins long. Le Tableau 4 présente les temps d'incubation nécessaires aux différents essais microbiologiques utilisés dans l'industrie pharmaceutique (35).

Tableau 4 : Temps d'incubation nécessaire aux différents essais microbiologiques utilisés dans l'industrie pharmaceutique. D'après Shintani, 2016 (35).

Essai		Temps d'incubation
Dénombrement microbien	Bactéries	3 à 5 jours
	Levures-moisissures	5 à 7 jours
Recherche de microorganismes spécifiés		18 à 72 heures
Essai de stérilité		14 à 21 jours
Essai des endotoxines bactériennes		1 heure
Identification microbienne	Phénotypique	3-5 jours
	Génotypique	1 jour
Essai d'efficacité des conservateurs antimicrobiens		7 à 28 jours
Mycoplasmes		28 jours

Les méthodes fondées sur la croissance sont également limitées par la **capacité des microorganismes à se reproduire sous un ensemble de conditions définies** (36). En effet, ne pas détecter de microorganismes lors d'un essai ne signifie pas dans l'absolu qu'aucun microorganisme ne se trouve dans le produit testé. L'absence de croissance microbienne doit quant à elle être interprétée comme l'absence de croissance microbienne dans les conditions de l'essai (22). Les microorganismes peuvent présenter une activité métabolique, mais ne pas être cultivables (37). Le recouvrement des microorganismes est affecté par de nombreuses variables, comme (36) :

- le milieu de culture
- la température et de la durée d'incubation
- les besoins nutritionnels du microorganisme
- l'état physiologique du microorganisme, celui-ci peut être stressé ou endommagé par la température, l'humidité, des forces ioniques importantes, un pH extrême, un choc osmotique, des résidus de produits chimiques antimicrobiens…
- les erreurs de dilutions
- les caractéristiques du produit testé
- le type de neutralisants utilisés

I.2. Avantages des méthodes alternatives

Depuis une vingtaine d'années, des méthodes rapides en microbiologie ou *Rapid Microbiological Methods* (RMM) se développent et sont peu à peu utilisées par l'industrie pharmaceutique (35). Tout comme les méthodes de référence, elles peuvent être basées sur la **croissance des microorganismes**, mais aussi sur une **mesure directe** ou l'**analyse de composants cellulaires** (17).

Certaines de ces méthodes alternatives réduisent le temps d'incubation d'au moins un facteur deux tandis que d'autres apportent un résultat en deux ou trois heures ou permettent une analyse en temps réel, les deux dernières approches n'étant clairement pas fondées sur la croissance des microorganismes (35). Le délai d'obtention des résultats est donc considérablement réduit par rapport à une méthode classique basée sur la croissance.

Dès lors (37) :

- le turnover de réalisation des essais peut être plus important avec un plus grand nombre d'échantillons analysés en un temps réduit
- les contaminations microbiennes peuvent être détectées de façon précoce avec la mise en place d'actions correctrices rapides

La production peut donc se poursuivre avec l'assurance que le procédé est sous contrôle microbiologique en continu (37). Les méthodes alternatives sont des outils efficaces pour **réduire le temps et les coûts liés à la libération des produits** (38).

Les méthodes qui ne sont pas basées sur la croissance permettent de s'affranchir des facteurs affectant le recouvrement des microorganismes. Ainsi, il est possible de dénombrer un plus grand nombre de microorganismes par la détection de microorganismes viables mais non cultivables (37).

De plus, la plupart de ces méthodes sont **automatisables**, il y a donc une **diminution de l'intervention humaine et du risque d'erreurs** et les données peuvent être recueillies informatiquement, ce qui peut une fois de plus améliorer la qualité des résultats obtenus et réduire le délai de rendu des résultats (37).

I.3. Obstacles à l'implantation des méthodes alternatives

Malgré les avantages certains que présentent ces nouvelles méthodes, leur implantation dans l'industrie pharmaceutique est lente. Plusieurs éléments peuvent l'expliquer et notamment l'obtention de résultats différents lors du dénombrement des microorganismes avec la méthode de référence et avec la méthode alternative (35). Les méthodes de référence se fondent sur la croissance des microorganismes avec un signal en Unité Formant Colonie (UFC). Cependant, il est établi que cette unité représente plutôt une estimation du nombre de microorganismes, car (39) :

- le recouvrement des microorganismes est influencé par plusieurs facteurs
- les microorganismes existant sous forme d'agrégats vont former une seule UFC

Il est alors probable qu'une nouvelle méthode, se basant sur un signal dans une unité n'étant pas l'UFC, permette la détection d'un plus grand nombre de microorganismes (22). Cependant, cela ne doit pas être associée à un risque plus grand pour le patient. L'important n'est pas que les résultats obtenus avec les deux méthodes soient identiques, mais que la nouvelle méthode permette au microbiologiste de prendre une décision équivalente concernant la qualité du produit (22). Se pose alors le problème des spécifications puisque les limites actuelles ont été établies avec les méthodes de référence en UFC (40). L'utilisation des statistiques pour comparer un signal en UFC et le signal d'une méthode alternative peut être envisagée, mais sa valeur reste limitée parce qu'on ne peut pas attendre des différentes méthodes qu'elles fournissent des résultats statistiquement comparables en terme de valeur moyenne et de variabilité. L'*US Pharmacopeia* conclut que l'UFC n'est pas une unité pouvant être utilisée pour l'évaluation de produits par des méthodes alternatives et recommande, tout comme la Pharmacopée Européenne, à l'utilisateur de développer des valeurs appropriées à la méthode, en s'appuyant par exemple sur une revue de la littérature scientifique (39).

L'industriel doit également tenir compte de la variabilité inhérente des méthodes microbiologiques lors de leur sélection, de leur développement et de leur validation. Cette variabilité est liée au fait que la microbiologie est une science logarithmique. Les méthodes microbiologiques sont capables de faire la distinction entre 100 et 1000 UFC (1 $\log_{10}$) mais elles ne seront peut-être pas capables de distinguer de plus petites différences (22). Par exemple, d'un point de vue technique, 18 UFC n'est pas différent de 10 UFC et 10 UFC est différent de 1 UFC mais pas de 5 UFC. Les méthodes basées sur la croissance donnant plus une estimation qu'un nombre exact de microorganismes, cette variabilité peut être à l'origine de difficultés lors de la comparaison de deux méthodes (36).

L'industriel peut également se retrouver face à des difficultés concernant la stratégie à adopter pour la validation de ces nouvelles méthodes et les paramètres devant être évalués. Si des *Guidelines* comme l'ICH Q2 (R1) sont bien adaptées à la validation des méthodes d'analyse physico-chimiques, elles sont plus difficiles à mettre en application quand il s'agit de la validation d'une méthode d'analyse microbiologique.

Par exemple, les définitions de paramètres tels que la linéarité, la robustesse ou la limite de détection ne sont pas bien adaptées à la microbiologie (40). D'autres guides ont été publiés pour aider les industriels à démontrer que les méthodes alternatives sont adaptées à l'usage attendu et notamment le ***PDA Technical Report No. 33 Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Testing Methods*** publié par un comité composé d'industriels, de représentants des agences réglementaires et des groupes de travail des Pharmacopées ou encore des fabricants d'équipements d'analyse (35). Ce rapport a été suivi du chapitre **5.1.6 Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique** de la Pharmacopée européenne et du chapitre ***<1223> Validation of alternative microbiological methods*** de l'*US Pharmacopeia* qui ont été initialement publiés en 2006 puis révisés en 2015.

Il ne faut pas non plus oublier que les équipements d'analyse peuvent représenter un investissement initial important et que du temps et des ressources seront nécessaires à la formation du personnel, à la qualification des équipements et à la validation de la méthode (37).

II. Validation des méthodes de référence

II.1. Méthodes de référence utilisées dans l'industrie pharmaceutique

Lorsque l'essai mis en œuvre est décrit par la Pharmacopée en vigueur, il n'a pas besoin d'être entièrement validé. Cependant, le laboratoire doit démontrer que la méthode qu'il souhaite mettre en œuvre est applicable à un produit et des conditions opératoires spécifiques (16). L'objectif ici est de présenter quelques-uns de ces essais et les paramètres à vérifier avant leur utilisation en routine au laboratoire.

II.1.1. Essai de dénombrement microbien

Cet essai est utilisé pour le contrôle microbiologique des produits non stériles. Il est décrit par le chapitre 2.6.12 de la Pharmacopée européenne et <*61*> de l'*US Pharmacopeia* qui sont harmonisés. Il permet le dénombrement des bactéries, moisissures et levures capables de croître en aérobiose (41,42). Les spécifications auquel les produits doivent répondre dépendent notamment de leur voie d'administration et sont précisées dans le chapitre **5.1.4 Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles (tableau 5.1.4.-1.)** de la Pharmacopée européenne (43).

Le dénombrement peut être réalisé par filtration sur membrane, dénombrement sur plaque (par ensemencement en profondeur ou étalement en surface) ou par la Méthode du Nombre le Plus Probable (NPP). Le choix de la méthode est fonction de la nature du produit à examiner et de la limite fixée pour le nombre de microorganismes (41).

II.1.1.i. Filtration sur membrane

C'est la méthode privilégiée lorsque la nature du produit le permet. L'échantillon de produit à tester est préparé et filtré sur deux membranes dont le diamètre des pores est d'au maximum 45 µm. Les membranes doivent ensuite être rincées puis une membrane est transférée sur un milieu gélosé aux peptones de caséine et soja pour permettre le Dénombrement des Germes Aérobies Totaux (DGAT) tandis que l'autre membrane est transférée sur un milieu Sabouraud dextrosé-gélosé afin de réaliser le Dénombrement des Moisissures et Levures Totales (DMLT). Les milieux sont ensuite incubés :

- à 30-35°C pendant 3 à 5 jours pour le milieu aux peptones de caséine et soja
- à 20-25°C pendant 5 à 7 jours pour le milieu Sabouraud dextrosé-gélosé

Le nombre d'Unités Formant Colonie (UFC) pour chaque milieu est ensuite calculé par gramme ou par millilitre de produit (41).

II.1.1.ii. Dénombrement sur plaque

(a) Ensemencement en profondeur

Cette méthode est également appelée méthode par **incorporation**. Un millilitre d'échantillon du produit à tester est introduit dans une boîte de Petri puis 15 à 20 mL de milieu gélosé aux peptones de caséine et soja ou de milieu Sabouraud dextrosé-gélosé sous forme liquide. Deux boîtes de Petri par milieu doivent être préparées. Les milieux sont ensuite incubés :

- à 30-35°C pendant 3 à 5 jours pour le milieu aux peptones de caséine et soja
- à 20-25°C pendant 5 à 7 jours pour le milieu Sabouraud dextrosé-gélosé

Le nombre moyen d'Unités Formant Colonie (UFC) pour chaque milieu est ensuite calculé par gramme ou par millilitre de produit (41).

(b) Etalement sur plaque

Cette méthode est proche de la méthode de l'ensemencement en profondeur, mais les milieux utilisés sont sous forme solide. Un faible volume d'échantillon (100 µL) est étalé sur le milieu. Deux boîtes de Petri par milieu doivent être préparées. Les conditions d'incubation et le calcul du nombre d'UFC sont identiques à ceux décrits pour la méthode par incorporation (41).

II.1.1.iii. Méthode du Nombre le Plus Probable (NPP)

Cette méthode est moins exacte et moins fidèle que les méthodes décrites précédemment. De plus, les résultats qu'elle fournit pour le dénombrement des moisissures sont peu fiables. Malgré ses inconvénients, l'emploi de cette méthode peut être justifié pour le contrôle de produits dont la biocharge est très faible puisque la limite de détection de cette méthode est plus basse que celle des autres méthodes.

Trois dilutions en série du produit à analyser doivent être préparées par une progression géométrique d'ordre 10, voir Figure 6. Un millilitre de la première dilution (10^{-1}) correspondant à 0.1 g ou 0.1 mL de produit à analyser, un millilitre de la deuxième dilution (10^{-2}) correspondant à 0.01 g ou 0.01 mL de produit à analyser et un millilitre de la troisième dilution (10^{-3}) correspondant à 0.001 g ou 0.001 mL de produit à analyser. Un millilitre de chaque dilution est transféré dans 9 à 10 mL de milieu de culture en 3 exemplaires, ce qui représente au total neuf tubes.

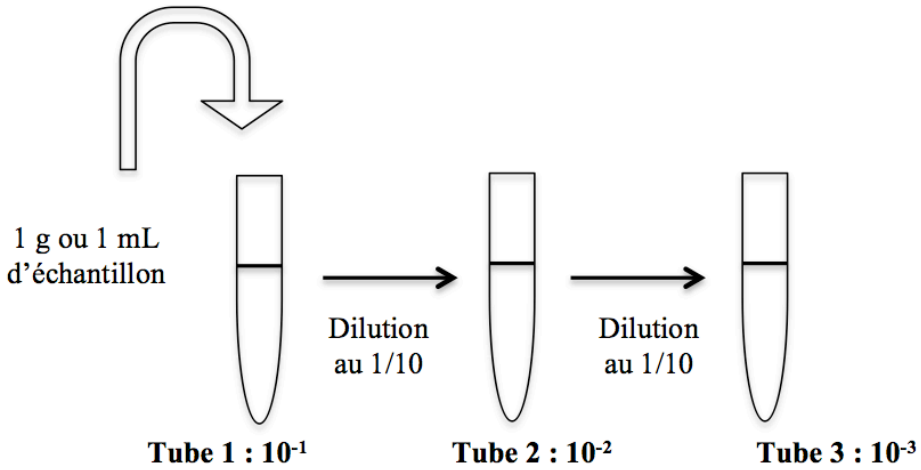


Figure 6 : Méthode du Nombre le Plus Probable (NPP).

Les neuf tubes sont ensuite incubés pendant trois jours au maximum à 30-35°C. Un tableau permet ensuite de déterminer le nombre le plus probable de microorganismes par gramme ou par millilitre en fonction du nombre de tubes par dilution présentant un trouble microbien (41).

II.1.2. Recherche de microorganismes spécifiés

Cet essai est utilisé pour le contrôle microbiologique des produits non stériles. Il est décrit par le chapitre 2.6.13 de la Pharmacopée européenne et <*62*> de l'*US Pharmacopeia* (44,45) qui sont harmonisés. Il permet de contrôler l'absence ou la présence des microorganismes suivants :

- Bactéries Gram-négatif résistantes aux sels biliaires
- *Escherichia coli*
- Salmonelles
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- Clostridies
- *Candida albicans*

Les spécifications auxquelles les produits doivent répondre dépendent notamment de leur voie d'administration et sont précisées dans le chapitre **5.1.4 Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles (tableau 5.1.4.-1.)** de la Pharmacopée européenne (43).

Dans la plupart des cas, le produit à examiner est dilué au 1/10 dans un milieu de culture non sélectif (milieu aux peptones de caséine et soja par exemple) puis la préparation est incubée à des conditions de températures et selon une durée définies pour permettre la revivification des microorganismes, mais pas leur multiplication. Après cette étape, une aliquote correspondant à 1 g (ou 1 mL) du produit à examiner est transférée dans un milieu d'enrichissement et incubée dans des conditions favorables à la croissance de l'espèce recherchée. Après incubation, un repiquage est effectué sur un milieu de culture sélectif (46). Le Tableau 5 présente les milieux utilisés pour la recherche de microorganismes spécifiés selon la Pharmacopée (44).

Tableau 5 : Milieux utilisés pour la recherche de microorganismes spécifiés selon la Pharmacopée.

Microorganisme recherché	Préincubation	Sélection	Subculture
Bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires	Milieu aux peptones de caséine et soja 20-25°C 2h	Milieu d'enrichissement Mossel pour les entérobactéries 30-35°C 24 à 48h	Milieu gélosé à la bile-violet-rouge 30-35°C 18 à 24h
Escherichia Coli	Milieu aux peptones de caséine et soja 30-35°C 18 à 24h	Milieu liquide de MacConkey 42 à 44 °C 24 à 48h	Milieu gélosé de MacConkey 30-35°C 18 à 72h
Salmonelles	Milieu aux peptones de caséine et soja 30-35°C 18 à 24h	Milieu liquide d'enrichissement pour les salmonelles Rappaport-Vassiliadis 30-35°C 18 à 24h	Milieu gélose xylose-lysine-désoxycholate 30-35°C 18 à 48h
Pseudomonas aeruginosa	Milieu aux peptones de caséine et soja 30-35°C 18 à 24h		Gélose cétirimide 30-35°C 18 à 72h
Staphylococcus aureus	Milieu aux peptones de caséine et soja 30-35°C 18 à 24h		Milieu gélosé Mannitol-sel 30-35°C 18 à 72h
Clostridies		Milieu renforcé pour clostridies 30-35°C 48h	Gélose Columbia 30-35°C 48 à 72h
Candida albicans	Milieu Sabouraud 30-35°C 3 à 5 jours		Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé 30-35°C 24 à 48h

II.1.3. Essai de stérilité

Le contrôle de la stérilité a pour objectif de vérifier l'absence de microorganismes vivants, il est décrit dans les chapitres 2.6.1 de la Pharmacopée européenne et <*71*> de l'*US Pharmacopeia* qui sont harmonisés (47,48). Il est réalisé sur un échantillon statistique représentatif de la production. Il se base sur la mise en culture en milieu liquide d'une membrane sur laquelle le produit a préalablement été filtré (**filtration sur membrane**) ou de l'échantillon lui même (**ensemencement direct**). La présence d'un microorganisme éventuel est détectée par l'apparition d'un trouble du milieu lié à sa croissance (49). Un repiquage peut être effectué si la croissance n'est pas clairement visible (produit à tester trouble, par exemple).

II.1.3.i. Filtration sur membrane

Elle est recommandée dès que possible, car elle est plus sensible que l'ensemencement direct (possibilité de filtration de grands volumes alors qu'un volume est limité pour l'ensemencement direct) (49). Le produit à tester est filtré sur une membrane de diamètre 50 mm et dont le diamètre des pores est inférieur à 0,45 µm. La membrane est ensuite rincée puis transférée dans un milieu de culture

approprié. La durée d'incubation est de 14 jours à 20-25°C ou à 30-35°C selon la nature du milieu utilisé (47).

II.1.3.ii. Ensemencement direct du milieu de culture

Le milieu de culture est ensemencé avec le produit à tester (le volume de l'échantillon testé correspond au maximum à 10% du volume du milieu de culture) puis incubé 14 jours à 20-25°C ou à 30-35°C selon la nature du milieu utilisé (47).

II.1.4. Essai des endotoxines bactériennes

Les endotoxines sont des lipopolysaccharides constitutifs de la paroi des bactéries Gram-négatif qui possèdent une activité **pyrogène** très élevée (50).

La détection ou la quantification des endotoxines bactériennes dans les produits pharmaceutiques s'appuient sur leurs propriétés à réagir avec un lysat d'amoebocyte de limule (LAL). Au contact des endotoxines, le système enzymatique du LAL est activé et une enzyme, la coagulase, va cliver le coagulogène, une protéine contenue dans le LAL, en un fragment de coaguline et un petit peptide (51). L'essai des endotoxines peut être réalisé selon trois méthodes décrites par la Pharmacopée européenne dans le chapitre 2.6.14 et par l'*US Pharmacopeia* dans le chapitre <*85*> : la **gélification**, la **turbidimétrie** et la **colorimétrie** (50,52). Ces chapitres sont harmonisés.

La limite en endotoxines est donnée en Unités Internationales (UI) par kilogramme de masse corporelle et dépend de la voie d'administration (53).

II.1.4.i. Méthode par gélification

Lors de la mise en contact du LAL et des endotoxines, les molécules de coaguline libérées s'agrègent pour former un gel. Des quantités équivalentes de la solution à examiner et du lysat sont mélangées dans un tube en verre apyrogène puis incubées une heure à 37±1°C. Après la période d'incubation, les tubes sont retournés à 180° : si un gel solide s'est formé dans le tube, le résultat est positif. Si le gel coule ou si aucun gel ne s'est formé, le résultat est négatif. Après avoir déterminé la sensibilité du lysat, ce test permet de déterminer la concentration minimale d'endotoxines produisant la coagulation (50,51).

Un essai similaire permet de quantifier les endotoxines bactériennes présentes dans la solution à examiner. Par multiplication du plus grand facteur de dilution pour lequel la gélification se produit par la sensibilité du lysat, il est possible d'extrapoler la concentration en endotoxines de l'échantillon (50,51).

II.1.4.ii. Méthode turbidimétrique

La formation d'un trouble lors de la libération de coaguline est à la base de la méthode turbidimétrique (51). L'accroissement de la turbidité est mesuré par photométrie (50).

Une courbe étalon est réalisée par dilutions successives d'une endotoxine de référence, et permet de déterminer la concentration en endotoxines dans l'échantillon (51).

Le principe de cette méthode peut s'appliquer à :

- la turbidimétrie **« en point final »** : la mesure (absorbance ou transmittance) est réalisée à la fin d'une période d'incubation (51)
- la turbidimétrie **cinétique** qui mesure le temps requis pour atteindre une absorbance ou une transmittance prédéfinies dans le mélange réactif ou la vitesse de développement de la turbidité (50)

II.1.4.iii. Méthode colorimétrique

Le coagulogène peut être remplacé par un peptide chromogène qui lors de la réaction des endotoxines avec le LAL sera clivé par la coagulase et libèrera un chromophore (51).

Le principe de cette méthode peut s'appliquer à :

- la colorimétrie **« en point final »** : la mesure (absorbance) est réalisée à la fin d'une période d'incubation par spectrométrie (51)
- la colorimétrie **cinétique** qui mesure le temps requis pour atteindre une absorbance dans le mélange réactif ou la vitesse de développement de la coloration (50)

Comme pour la méthode turbidimétrique, une courbe étalon est réalisée à partir de solution de concentration connue en endotoxines afin de déterminer la concentration en endotoxines dans l'échantillon (51).

II.2. Paramètres dont le laboratoire doit s'assurer pour la mise en œuvre des méthodes

II.2.1. Essais requérant la détermination de microorganismes vivants dans un produit

Ces essais sont notamment l'**essai de dénombrement microbien**, la **recherche de microorganismes spécifiés** ou l'**essai de stérilité**.

Le laboratoire doit s'assurer :

- que la méthode qu'il souhaite mettre en œuvre permet le recouvrement de microorganismes viables, c'est-à-dire que la croissance des microorganismes n'est pas inhibée par une activité antimicrobienne du produit
- que dans le cas où le produit testé possède une activité antimicrobienne, il est capable de la neutraliser efficacement

Dans le cas où le laboratoire échoue à démontrer une neutralisation et un recouvrement adéquat, il y a un risque de sous-estimer le nombre de microorganismes. Les chapitre **2.6.12 Contrôle de la qualité microbiologique de produits non stériles : essais de dénombrement microbien** de la Pharmacopée européenne et ***<61> Microbiological examination of nonsterile products : microbial enumeration tests*** de l'*US Pharmacopeia* décrivent précisément ces essais d'applicabilité (41,42).

II.2.1.i. Recherche de propriétés antimicrobiennes du produit testé

Dans le cas de l'**essai de dénombrement microbien**, deux préparations sont réalisées : l'une contient le produit, l'autre non (témoin positif). Elles sont inoculées avec un même volume de suspension microbienne permettant d'obtenir un inoculum d'au maximum 100 Unités Formant Colonies (UFC) et sont soumises à la même technique. Le taux de recouvrement obtenu à partir de l'échantillon qui a été préparé avec le produit doit être comparé au taux de recouvrement obtenu à partir d'un témoin positif ne contenant pas de produit. (41).

Pour chacun des microorganismes de référence testés, le nombre moyen d'UFC obtenu pour l'échantillon ne doit pas différer de plus d'un facteur 2 de la valeur obtenue en l'absence du produit (témoin). Cela signifie que si le dénombrement du témoin donne un résultat de 100 UFC, le résultat du dénombrement en présence de produit doit être compris entre 50 et 200 UFC (facteur de recouvrement compris entre 0,5 et 2). Pour la méthode du nombre le plus probable (NPP), la valeur calculée à partir de l'inoculum doit se trouver dans les limites de confiance à 95% des résultats obtenus avec le témoin (41).

Pour la **recherche de microorganismes spécifiés**, l'échantillon est inoculé avec une suspension de microorganismes tests contenant au maximum 100 UFC. Lorsque les essais décrits en II.1.2. sont mis en œuvre avec les milieux appropriés, la présence des microorganismes spécifiés doit être démontrée (44).

Pour le **test de stérilité**, l'échantillon de produit peut être filtré puis rincé avec un diluant contenant un inoculum d'au maximum 100 UFC avant d'être transféré dans un milieu de culture ou directement ensemencé dans le milieu de culture qui sera ensuite inoculé avec au maximum 100 UFC. La croissance microbienne doit être visuellement comparable entre l'échantillon de produit et le témoin positif (47). Un repiquage peut être effectué si la croissance n'est pas clairement visible (produit à tester trouble, par exemple).

Le Tableau 6 présente les souches de références utilisées pour l'essai d'applicabilité des méthodes précédemment citées. Le choix des souches utilisées dépendra de la méthode validée, de la formulation du produit et de sa voie d'administration et est précisé par la Pharmacopée (41,44,47).

Tableau 6 : Microorganismes de référence utilisés pour la validation des méthodes issues de la Pharmacopée

Souches	ATCC	CIP	NCTC	NCPF	NCIMB	NBRC	IP	IMI
Staphylococcus aureus	6538	4.83	10788		9518	13276		
Pseudomonas aeruginosa	9027	82.118			8626	13275		
Bacillus subtilis	6633	52.62			8054	3134		
Candida albicans	10231			3179		1594	48.72	
Aspergillus brasiliensis	16404					9455	1431.83	149007
Escherichia coli	8739	53.126			8545	3972		
Clostridium sporogenes	19404 ou 11437	79.3 ou 100651	532			14293		
Salmonelles Thyphimurium Aboni	140128	80.39	6017			100797		

ATCC : *American Type Culture Collection* : Collection Américaine de Cultures Types / **CIP** : Collection de Bactéries de l'Institut Pasteur / **NCTC** : *National Collection of Type Cultures* : Collection Nationale de Cultures Types / **NCPF** : *National Collection of Pathogenic Fungis* : Collection Nationale de Champignons Pathogènes / **NCIMB** : *National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria* : Collection Nationale de Bactéries Industrielles, Alimentaires et Marines / **NBRC** : *NITE Biological Resource Center* : Centre de Ressources Biologiques de l'Institut National de Technologie et d'Evaluation / **CIP** : Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) Institut Pasteur / **IMI** : *International Mycologic Institute* : Institut International de Mycologie

II.2.1.ii. Neutralisation/Élimination de l'activité antimicrobienne

Dans le cas où le produit présente une activité antimicrobienne, elle doit être neutralisée (41).

Cette neutralisation peut être réalisée (41,54) :

- en augmentant la dilution (plus grand volume de diluant ou de milieu de culture ajouté à l'échantillon) lors de la préparation de l'échantillon, car l'effet bactéricide d'un agent dépend de sa concentration
- en ajoutant à l'échantillon des agents neutralisants de l'activité antimicrobienne, voir Tableau 7 (41,55)

Tableau 7 : Agents usuels de neutralisation des substances interférentes.

Substance interférente	Méthode de neutralisation possible
Alcools	Dilution, Polysorbate
Aldéhydes	Dilution, Glycine, Thiosulfate
Ammoniums quaternaires (QAC)	Lécithine, Polysorbate
Bis-guanides	Lécithine
Chlorhexidine	Lécithine, Polysorbate
EDTA (édétate)	Ions Mg^{2+} ou Ca^{2+}
Glutaraldéhydes	Glycine, Hydrogénosulfite de sodium (bisulfite de sodium)
Halogènes	Thiosulfates
Iode	Polysorbate
Mercuriels	Hydrogénosulfite de sodium (bisulfite de sodium), Thioglycollates, Thiosulfates
Parahydroxybenzoates (parabènes)	Lécithine, Polysorbate
Phénoliques	Dilution, Polysorbate et Lécithine
Hypochlorite de sodium	Sodium thiosulfate
Sorbates	Dilution

- en filtrant le produit : la membrane va retenir les microorganismes et laisser passer l'agent antimicrobien
- en combinant les modifications précédemment citées

La méthode de neutralisation doit ensuite être validée : il faut démontrer d'une part son efficacité à neutraliser l'activité antimicrobienne du produit, mais également son absence de toxicité vis-à-vis des microorganismes potentiellement présents dans l'échantillon analysé par comparaison avec un blanc comportant le neutralisant mais pas le produit (41). Le chapitre <*1227*> de l'USP propose de comparer les résultats obtenus pour trois groupes différents au cours de trois essais indépendants (54):

- un groupe « test » : produit neutralisé inoculé avec 100 UFC du microorganisme testé
- un groupe « contrôle » : le traitement est identique à celui du groupe « test » mais un diluant remplace le produit
- un groupe de référence : il contient 100 UFC du microorganisme testé mais pas de neutralisant ni de produit

Un recouvrement comparable entre le groupe « test » et le groupe « contrôle » démontre que la méthode de neutralisation est efficace. Un recouvrement comparable entre le groupe « test » et le groupe de référence démontre que la méthode de neutralisation n'est pas toxique pour le microorganisme (54). Le recouvrement peut être évalué sur un milieu gélosé, par filtration sur membrane ou dans un milieu liquide (54). Des divergences sont à noter pour les critères d'acceptation, notamment pour l'essai de dénombrement microbien. En effet, selon le chapitre 2.6.12 de la Pharmacopée européenne et le chapitre <*61*> de l'*US Pharmacopeia* pour que le taux de recouvrement soit comparable, il ne doit pas différer de plus d'un facteur 2, c'est-à-dire que le taux de recouvrement minimum est de 50% tandis que le chapitre <*1227*> de l'*US Pharmacopeia* relatif à la validation du recouvrement préconise un taux de recouvrement d'au moins 70%.

II.2.2. Autres paramètres à vérifier

Dans le cas de l'**essai des endotoxines bactériennes**, des contrôles préliminaires sont nécessaires afin d'assurer la validité et la fidélité de l'essai. L'analyste doit notamment s'assurer que la solution à examiner ne contient pas de **facteurs d'interférence** dans les conditions expérimentales utilisées. Si elle en contient, ces facteurs doivent être éliminés puis il faut s'assurer que la méthode choisie pour éliminer l'interférence n'a pas entraîné de déperdition d'endotoxines. La démarche à suivre est décrite dans le chapitre correspondant de la Pharmacopée (50).

III. Validation des méthodes alternatives

III.1. Principes des méthodes alternatives en microbiologie

La Pharmacopée européenne classe les méthodes alternatives en microbiologie en trois catégories (17) :

- méthodes basées sur la croissance
- mesure directe
- analyse de composants cellulaires

III.1.1. Méthodes basées sur la croissance

Ce sont les méthodes pour lesquelles un signal est détectable après une période de subculture, elles dépendent de la croissance des microorganismes dans un milieu de culture. Elles impliquent la plupart du temps la mesure d'un signal biochimique ou physiologique. Le but de ces méthodes est de permettre l'obtention d'un résultat dans un délai plus court en réduisant le temps d'incubation (17,37).

III.1.1.i. Méthodes électrochimiques ou impédance

La multiplication et le métabolisme des microorganismes entraînent des modifications des propriétés électriques du milieu de culture qui sont mesurées par des électrodes en contact avec le milieu (17).

III.1.1.ii. Mesure de la consommation ou production d'un gaz

La multiplication et le métabolisme des microorganismes entraînent la production de métabolites ou la consommation d'éléments nutritifs. La croissance des microorganismes induit notamment la production de CO_2 et la consommation d'O_2 qui peuvent être mesurées par des transducteurs de pression réagissant à la production ou à la consommation d'un gaz (17).

III.1.1.iii. Bioluminescence

L'adénosine triphosphate (ATP) libéré par les microorganismes est dosé par un système enzymatique émettant de la lumière. La lumière émise est mesurée par un bioluminomètre et s'exprime en Unité de Lumière Relative (ULR) (17).

III.1.1.iv. Microcalorimétrie

La chaleur produite par le catabolisme des microorganismes est détectée par un calorimètre (17).

III.1.1.v. Turbidimétrie

La croissance des microorganismes est à l'origine d'une modification de l'opacité du milieu de culture qui peut être quantifiée par mesure de la densité optique avec un spectrophomètre standard (17).

III.1.1.vi. Méthodes utilisant les phages

Des méthodes permettent la détection des conséquences de l'infection des bactéries par un virus. Par exemple, la mesure de composants intracellulaires libérés par les bactéries ou la bioluminescence après incorporation du matériel génétique d'un phage génétiquement modifié dans la cellule microbienne (17).

III.1.2. Mesure directe

Ce sont les méthodes pour lesquelles les cellules individuelles sont différenciées et visualisées, elles n'impliquent pas la croissance des microorganismes, mais s'appuient sur la viabilité des cellules et une excitation au laser (17,37).

III.1.2.i. Cytométrie en phase solide

Les microorganismes retenus par filtration sur une membrane sont marqués par un fluorophore dont le clivage par une enzyme libère une entité fluorescente. L'excitation au laser permet ensuite la détection des microorganismes fluorescents viables (17).

III.1.2.ii. Cytométrie en flux

Le principe est proche de celui de la cytométrie en phase solide, mais les microorganismes marqués sont en suspension et les signaux émis sont détectés lors de leur passage dans un cytomètre de flux (17).

III.1.2.iii. Technique de filtration et épifluorescence directe (DEFT)

Les microorganismes retenus par filtration sur une membrane sont colorés par un réactif fluorescent détecté sous éclairage épifluorescent (17) .

III.1.3. Analyse de composants cellulaires

Ce sont des méthodes basées sur la mesure indirecte d'une croissance microbienne par l'expression de composants cellulaires spécifiques (17).

III.1.3.i. Méthodes immunologiques

Ces méthodes sont basées sur la détection de réactions de type antigène-anticorps. Elles ne démontrent pas nécessairement la présence de microorganismes viables (17).

III.1.3.ii. Profil de composition en acides gras

Cette méthode permet l'identification de microorganismes par comparaison de la composition en acide gras d'un isolat inconnu à des profils d'isolats connus figurant dans une base de données (17).

III.1.3.iii. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Cette méthode permet l'identification de microorganismes par comparaison du profil obtenu par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier aux profils d'isolats connus figurant dans une base de données (17).

III.1.3.iv. Spectroscopie de masse

Cette méthode permet l'identification de microorganismes par comparaison des spectres de masse caractéristiques des microorganismes à des profils connus. Les spectres de masse peuvent être obtenus (17) :

- par l'analyse des produits de décomposition gazeux libérés par des isolats microbiens chauffés
- ou par l'analyse de cellules microbiennes intactes ionisées dans un spectromètre de masse MALDI-TOF, c'est-à-dire un spectromètre de masse utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI : *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) et un analyseur à temps de vol (TOF : *Time-Of-Flight*).

III.1.3.v. Dosages biochimiques fondés sur des réactions physiologiques

Ces méthodes permettent l'identification des microorganismes par comparaison du profil de réactions biochimiques avec une base de données. Le profil biochimique est établi manuellement ou de façon automatisée avec des trousses d'identification utilisant une propriété biochimique particulière du microorganisme (17).

III.1.3.vi. Technique d'amplification des acides nucléiques

Cette méthode consiste à amplifier un fragment spécifique d'ADN par *Polymerase Chain Reaction* (PCR) puis à analyser les fragments amplifiés par différentes méthodes comme l'analyse de la taille des fragments, l'analyse d'une séquence spécifique, la réamplification ou la détection spécifique par hybridation avec une sonde associée à un marqueur fluorescent (17).

III.1.3.vii. Empreinte génétique

Cette méthode permet la discrimination des souches microbiennes. Les cellules microbiennes sont lysées et l'ADN extrait est fragmenté par une enzyme de restriction. Les fragments d'ADN sont ensuite séparés par électrophorèse en fonction de leur taille. Le profil ainsi obtenu peut être comparé aux profils d'isolats connus (17).

III.2. Comparaison des textes de la Pharmacopée européenne et de l'US Pharmacopeia pour la validation des méthodes alternatives en microbiologie

Les Pharmacopées européenne et américaine ont émis des recommandations sur la validation des méthodes alternatives en microbiologie et, bien que certaines étapes soient très similaires, leurs approches respectives divergent quelque peu.

Le but de ce chapitre est de décrire les recommandations de la Pharmacopée européenne tout en faisant un parallèle avec la Pharmacopée américaine pour mettre en avant les points communs et les différences entre les deux textes.

Tout d'abord, il est intéressant de préciser que la Pharmacopée européenne distingue deux niveaux de validation : une **validation primaire**, qui relève de la responsabilité du développeur de la méthode puis une **validation pour l'usage effectif prévu**, qui doit être prise en charge par l'utilisateur de la méthode (17).

III.2.1. Validation Primaire

Lors de la phase de validation primaire, le développeur doit apporter tous les détails concernant la méthode : quels sont les conditions d'application, les produits et les équipements requis et le signal attendu (17) ? Le développeur doit également caractériser la méthode en décrivant au minimum (17) :

- le traitement appliqué à l'échantillon avant l'analyse
- le type de réponse attendue
- la spécificité de la réponse
- la limite de détection
- l'intervalle de mesure
- la linéarité de la réponse
- l'exactitude et la fidélité de la réponse
- la robustesse de la méthode
- les limites d'applicabilité

Cette exigence n'est pas reprise par l'*US Pharmacopeia*, cependant la validation de la méthode alternative doit être précédée de la rédaction d'un cahier des charges, le *User Requirements Specification* (URS) *document*. Ce document doit notamment inclure des informations sur l'usage attendu, les utilisateurs, les exigences opérationnelles, le cycle de vie, les contraintes, les capacités et la durabilité de la méthode (22).

III.2.1. Analyse bénéfice-risque

La Pharmacopée européenne préconise ensuite de réaliser une analyse bénéfice/risque pour comparer la méthode de référence et la méthode alternative quant aux informations apportées et la précision de ces informations. L'utilisation de la méthode alternative se justifie si elle répond à la question posée et si elle n'est pas plus restrictive que la méthode conventionnelle (17). L'*US Pharmacopeia* statue sur le fait que les méthodes alternatives peuvent être employées à la place des méthodes de référence si elles apportent des avantages en termes d'exactitude,

sensibilité, précision, sélectivité, facilité d'automatisation ou de recueil des données informatiques (22).

III.2.2. Qualification des équipements et instruments

Comme décrit en III.1 de la Partie I, la qualification des équipements ou des instruments analytiques employés pour la méthode est un prérequis indispensable à la validation rappelé à la fois par la Pharmacopée européenne et par l'*US Pharmacopeia*.

L'*US Pharmacopeia* renvoie l'utilisateur au chapitre ***<1058> Analytical instrument qualification*** et liste brièvement quatre phases de qualification (33) :

1. L'établissement d'un cahier des charges utilisateurs ou *User Requirements Specifications* (URS) *document*
2. La qualification d'installation, QI
3. La qualification opérationnelle, QO
4. La qualification de performance, QP

La Pharmacopée européenne mentionne elle aussi les phases de QI, QO et QP mais également la phase de qualification de conception, QC. Des précisions sont apportées sur la phase de QP, il s'agit d'apporter « la preuve documentée que l'équipement, installé et utilisé conformément aux procédures opératoires, donne de façon constante des performances conformes à des critères préétablis et donc des résultats corrects pour la méthode » (17). Cette phase peut donc inclure : la validation de la méthode, la démonstration de l'équivalence par rapport à la méthode de référence et la vérification de l'impact du produit sur les performances de la méthode analytique (39).

III.2.3. Qualification des performances des méthodes analytiques

Avant la phase de validation pour l'usage effectif prévu, la Pharmacopée européenne demande que les performances des méthodes soient déterminées. Dans cette phase de validation, les critères de performance de la méthode sont évalués en l'**absence du produit à tester**, avec des **microorganismes de référence** et peuvent impliquer une **comparaison des performances avec celle de la méthode de référence** (39).

Cette étape peut se rapprocher de l'étape de validation de la méthode alternative de l'*US Pharmacopeia* qui consiste à démontrer que cette méthode pourra détecter ou dénombrer un panel de microorganismes. En effet, lors de cette phase, les essais sont réalisés en **l'absence de produit** et avec des **microorganismes de référence**. Cependant, bien que cela ne soit pas toujours clairement exprimé, les performances de la méthode alternative ne sont pas comparées aux performances de la méthode de référence à ce stade-là de la validation, mais lors de la démonstration de l'équivalence, option 2 : équivalence des performances (39).

Comme décrit précédemment, trois grands types d'essais microbiologiques peuvent être distingués : les **essais qualitatifs,** les **essais quantitatifs** et les **essais d'identification**. Cela implique d'établir trois ensembles distincts de critères de

validation. Le texte de la Pharmacopée européenne présente les critères pour la validation de ces trois types d'essais tandis que le texte de l'*US Pharmacopeia* présente uniquement les critères pour la validation des essais qualitatifs et quantitatifs. Les essais d'identification sont traités dans un chapitre distinct (*<1113> Microbial characterization, identification and strain typing*). Le Tableau 8 présente les paramètres de validation par type de test selon la Pharmacopée européenne et selon l'*US Pharmacopeia*.

Tableau 8 : Paramètres de validation par type d'essai, selon la Ph. Eur. et selon l'USP

Paramètre de validation	Essai qualitatif		Essai quantitatif	
	Ph. Eur.	USP	Ph. Eur.	USP
Exactitude	Oui	Non	Oui	Oui
Précision ou fidélité	Oui	Non	Oui	Oui
Spécificité	Oui	Oui	Oui	Oui
Limite de détection	Oui	Oui	Non	Oui
Limite de quantification	Non	Non	Oui	Oui
Linéarité	Non	Non	Oui	Oui
Intervalle de mesure	Non	Non	Oui	Oui
Robustesse	Oui	Oui	Oui	Oui
Répétabilité	/	Oui	/	Oui
Précision intermédiaire	/	Oui	/	Oui
Équivalence	/	Oui	/	Oui

Quelques différences peuvent être observées (cases grisées), elles sont notamment dues à la façon dont les phases de la validation sont identifiées et mises en œuvre dans les deux textes. La répétabilité et la précision intermédiaire sont des sous-ensembles de la précision et sont regroupées sous le terme de « fidélité » dans la Pharmacopée européenne (39).

La Pharmacopée européenne et l'*US Pharmacopeia* définissent l'ensemble de ces critères, mais contrairement à la Pharmacopée européenne, l'*US Pharmacopeia* ne spécifie pas de quelle façon évaluer tous ces critères, seules des précisions pour l'évaluation de la spécificité et de la limite de détection sont mentionnées.

III.2.3.i. Spécificité

La Pharmacopée européenne définit la spécificité d'une méthode comme **« sa capacité à détecter la gamme voulue de microorganismes potentiellement présents dans l'échantillon examiné »** (17). Cette définition est très similaire à celle de l'*US Pharmacopeia* qui précise que la « gamme » de microorganismes peut correspondre à des microorganismes pouvant présenter un risque pour le patient ou le produit, aux microorganismes retrouvés dans l'environnement de production du produit et lors du contrôle de produits défectueux, ou à d'autres microorganismes représentatifs, appropriés pour l'évaluation de la méthode (22).

Pour les **méthodes basées sur la croissance**, la spécificité peut être démontrée par l'essai de fertilité, c'est-à-dire en ensemençant des échantillons de milieu avec un inoculum d'au maximum 100 UFC. La méthode doit permettre le recouvrement des

microorganismes tests puis les résultats obtenus sont comparés avec ceux obtenus par la méthode de référence (17).

Si la méthode ne s'appuie pas sur la croissance, la spécificité doit assurer l'absence d'interférences (17). L'*US Pharmacopeia* précise que des faux positifs et des faux négatifs sont utilisés pour démontrer cette absence d'interférences. Les interférences pourraient être causées par des éléments étrangers présents dans le système, comme de l'ATP extracellulaire, de l'ADN, des facteurs inhibiteurs ou des facteurs d'accroissement (22).

L'*US Pharmacopeia* ajoute que tous les microorganismes devraient être retrouvés et identifiés pour les méthodes basées sur la croissance et que pour les méthodes qui ne sont pas basées sur la croissance, les microorganismes devraient être retrouvés et identifiés lorsque cela est possible (22).

La Pharmacopée européenne spécifie que lorsque la méthode l'exige, des mélanges de microorganismes peuvent être utilisés lors de la validation (17).

Dans l'exemple proposé par la Pharmacopée européenne, la détermination doit être réalisée au moins trois fois pour chaque microorganisme et tous les microorganismes de référence doivent être détectés (17).

III.2.3.ii. Exactitude

Dans le cas de la validation d'un **essai quantitatif**, l'exactitude correspond à **« l'étroitesse de l'accord entre les résultats respectivement obtenus par la méthode alternative et par la méthode pharmacopée »** (17). Cette définition de la Pharmacopée européenne correspond à la définition de l'*US Pharmacopeia*.

L'exactitude s'exprime par le pourcentage de recouvrement des microorganismes obtenu avec la méthode, elle peut être établie (17) :

- Par l'analyse d'au moins cinq suspensions dont les concentrations sont comprises dans l'intervalle de mesure, et ce pour chaque microorganisme de référence. La méthode doit fournir une estimation du nombre de microorganismes viables fournis qui ne soit pas inférieure à 70% de l'estimation obtenue avec la méthode pharmacopée.

- En parallèle de l'essai réalisé pour vérifier la linéarité de la méthode (voir III.2.3.vi). La méthode est exacte si, après analyse statistique, la pente de la droite de régression n'est pas significativement différente de 1 et si son ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0.

Pour un **essai qualitatif** alternatif, l'exactitude s'exprime en termes de **proportion de faux négatifs** obtenus avec la nouvelle méthode par rapport à la méthode pharmacopée. La procédure alternative pour la détermination de la limite de détection (voir III.2.3.iv) permet de calculer le pourcentage de faux négatifs pour la méthode alternative et pour la méthode pharmacopée. Les pourcentages de faux négatifs doivent être comparés pour les deux ou trois suspensions dont la concentration est inférieure à la limite de détection donnant un résultat positif. Le

pourcentage de faux négatifs obtenu avec la méthode à valider doit être inférieur ou égal à celui obtenu avec la méthode pharmacopée (17).

III.2.3.iii. Fidélité ou précision

Pour un **essai quantitatif** alternatif, la fidélité est **« le degré d'agrément obtenu entre les résultats individuels lorsque la procédure est appliquée de façon répétée à des échantillons multiples de suspensions homogènes de microorganismes »** (17). Cette définition de la Pharmacopée européenne correspond à la définition de l'*US Pharmacopeia*.

Elle s'exprime en termes de variance, d'écart type ou de coefficient de variation d'une série de résultats. La méthode consiste à dénombrer plusieurs fois, au cours d'une unique session de travail, une suspension de microorganismes dont la concentration se situe au centre de l'intervalle de mesure. D'autres sessions sont ensuite organisées en faisant varier un grand nombre de paramètres : analyste, équipement… La méthode est valide pour un coefficient de variation de 10 à 15% et qui n'est pas plus élevé que le coefficient de variation de la méthode pharmacopée (17).

Pour un **essai qualitatif** alternatif, la fidélité s'exprime en termes de **proportion de résultats positifs** obtenus avec la nouvelle méthode par rapport à la méthode pharmacopée. La procédure alternative pour la détermination de la limite de détection (voir III.2.3.iv) permet de calculer puis de comparer les pourcentages de résultats positifs obtenus avec la méthode alternative et la méthode pharmacopée. La méthode est valide si le pourcentage de positifs obtenus à la limite de détection est de 100% et s'il est supérieur ou égal à celui obtenu avec la méthode pharmacopée (17).

III.2.3.iv. Limite de détection

La Pharmacopée européenne définit la limite de détection comme **« le plus petit nombre de microorganismes pouvant être détecté dans un échantillon dans les conditions expérimentales décrites »** (17). La définition de l'*US Pharmacopeia* est similaire.

La Pharmacopée européenne présente deux options pour déterminer la limite de détection (17) :

- Pour chaque microorganisme de référence, l'analyste prépare une suspension de faible concentration (la concentration est ajustée jusqu'à ce que la moitié des échantillons présentent une croissance avec la méthode pharmacopée) puis réalise l'analyse en parallèle avec les deux méthodes et mesure le recouvrement pour chacune des méthodes. La mesure doit être répétée plusieurs fois (au moins cinq). L'aptitude des deux méthodes à détecter la présence d'un microorganisme isolé peut ensuite être établie par une méthode statistique (test du χ^2).

- Procédure alternative : pour chaque microorganisme de référence, l'analyste prépare des séries de dilutions dont la concentration se distribue autour de 5 UFC (par exemple, de 10 à 0.75 UFC/inoculum) puis réalise l'analyse en parallèle avec les deux méthodes, sur cinq séries indépendantes. La limite de détection

correspond à la dernière dilution pour laquelle un résultat positif est obtenu pour les cinq séries. Pour que la méthode soit valide, la limite de détection de la nouvelle méthode doit être inférieure ou égale à celle de la pharmacopée.

La stratégie de l'*US Pharmacopeia* est comparable puisqu'elle propose également deux options proches de celles décrites dans la Pharmacopée européenne (22):

- Pour chaque microorganisme testé, l'analyste inocule une solution à une concentration pour laquelle la moitié des échantillons montre une croissance dans l'essai de référence. Il réalise ensuite l'analyse en parallèle avec la méthode alternative et la méthode de référence et mesure le recouvrement. Le test doit être répété un nombre de fois suffisant. Une analyse statistique (test du χ^2 ou autre test approprié) doit ensuite être employée pour démontrer l'équivalence du recouvrement entre les deux méthodes.

- Méthode du nombre le plus probable : pour chaque microorganisme testé, l'analyste réalise des séries de dilutions de façon à obtenir des concentrations de microorganismes allant de 10^1 UFC à 10^{-2} UFC ou 5 UFC à 10^{-1} UFC. Il sélectionne ensuite plusieurs séries de dilutions. Pour chaque dilution, la mesure est répétée au moins cinq fois. Le nombre le plus probable est déterminé à partir de trois séries de dilution donnant à la fois des résultats positifs et négatifs. Une analyse statistique (test du χ^2 ou autre test approprié) permet de démontrer l'équivalence du recouvrement entre les deux méthodes.

  La comparaison à la méthode de référence à ce stade-là n'est pas très claire puisqu'elle doit avoir lieu lors de la démonstration de l'équivalence des méthodes (39).

III.2.3.v. Limite de quantification

La Pharmacopée européenne définit la limite de quantification comme **« le plus petit nombre de microorganismes pouvant être dénombré avec exactitude »** (17). Cette définition est très similaire à celle de l'*US Pharmacopeia*.

Il est possible d'utiliser les données de l'essai de linéarité (voir III.2.3.vi) car la limite de quantification correspond à la plus faible concentration de l'intervalle de linéarité. La limite de quantification de la méthode alternative doit être inférieure ou égale à la limite de quantification de la méthode pharmacopée (17).

III.2.3.vi. Linéarité

La Pharmacopée européenne définit la linéarité d'une méthode comme sa **« capacité à produire, sur un certain intervalle, des résultats proportionnels à la concentration en microorganismes de l'échantillon »** (17). Cette définition est très similaire à celle de l'*US Pharmacopeia*.

Afin d'établir la linéarité de la méthode, trois séries d'essais indépendants doivent être réalisées. Au cours de chaque essai, des suspensions de chaque microorganisme de référence doivent être préparées à plusieurs concentrations (environ cinq) comprises dans l'intervalle de mesure. Les mesures doivent être répétées plusieurs fois pour chaque concentration. Une fois l'ensemble des essais

réalisé, une analyse statistique doit être conduite. La linéarité est établie si l'analyse statistique détermine la régression linéaire, l'existence d'une pente et la non-absence d'ajustement au risque 5%, l'équation $y = ax + b$ avec a, ordonnée à l'origine et b, pente. Dans le cas où une analyse statistique n'est pas possible, la pente ne doit pas s'écarter de la valeur 1 de plus de 20%, et le coefficient de corrélation r^2, doit être supérieur ou égal à 0,9 (17).

III.2.3.vii. Intervalle de mesure

La Pharmacopée européenne définit l'intervalle de mesure comme **« l'intervalle compris entre la plus faible et la plus forte concentration en microorganismes ayant pu être déterminées avec la fidélité, l'exactitude et la linéarité voulue en appliquant la méthode décrite »** (17). Cette définition est très similaire à celle de l'*US Pharmacopeia*.

Il peut être déduit des études de fidélités, d'exactitude et de linéarité.

III.2.3.viii. Robustesse

La Pharmacopée européenne définit la robustesse d'une méthode comme sa **« capacité à ne pas être affectée par des variations faibles, mais délibérées de paramètres opératoires »** (17). L'*US Pharmacopeia* donne une définition très proche et propose des exemples de paramètres qu'il est possible de faire varier : le volume de réactif, le temps d'incubation ou la température ambiante. La méthode est robuste si elle permet, malgré la variation des paramètres, d'obtenir un dénombrement statistiquement correct des microorganismes de référence (22).

Le fabricant est le plus à même de fournir cette information, cependant, si l'utilisateur apporte des modifications à certains paramètres, les effets sur la robustesse doivent être évalués (17).

III.2.4. Validation pour l'usage effectif prévu

Après la qualification des performances, la validation doit se poursuivre par l'application de la méthode alternative aux échantillons à analyser. En effet, l'analyste doit s'assurer que le produit testé n'impacte pas les performances et le signal de la méthode alternative. Pour cela, il utilise des microorganismes tests. Les questions à se poser selon le contexte peuvent être, par exemple (17) :

- la compatibilité de la réponse avec les modalités de préparation de l'échantillon
- les limites et plages de détection de la méthode par rapport à la taille et à la disponibilité des échantillons
- la spécificité de la réponse par rapport aux différents constituants du produit
- la linéarité de la réponse par rapport à tous les types d'échantillons à analyser
- l'exactitude et la fidélité de la réponse par rapport à tous les types d'échantillons à analyser
- la robustesse de la méthode par rapport à tous les types d'échantillons à analyser

Les critères d'acceptation doivent être définis au préalable en fonction de l'application et des données de validation.

Le chapitre 5.1.6 donne des exemples pour la conduite des essais de validation des méthodes de bioluminescence qualitatives, semi-quantitatives et quantitatives. Comme pour les méthodes de références, il faut s'assurer que **le produit n'inhibe pas la croissance des microorganismes dans les conditions de l'essai**. Un inoculum d'au maximum 100 UFC de chaque microorganisme de référence est ajouté à une portion de milieu contenant le produit. Un résultat positif (essai qualitatif) ou un recouvrement des microorganismes supérieur ou égal à 70% (essai quantitatif) est attendu. L'analyste doit ensuite s'assurer que **le produit ne génère pas d'interférences**, c'est-à-dire que le produit n'induit pas de résultats faussement positifs par génération de lumière parasite ou d'ATP non microbien, ou n'induit pas de résultats faussement négatifs en affaiblissant la détection d'ATP. Pour cela, l'analyste compare les résultats obtenus lorsque l'essai est réalisé sur le milieu de culture seul, sur le milieu de culture avec le produit et sur le milieu de culture avec de l'ATP. La Pharmacopée européenne recommande que ces phases de validation soient réalisées sur **trois essais indépendants**, en utilisant au moins deux lots différents de produit (17).

L'*US Pharmacopeia* recommande également la validation par rapport au produit à examiner, cette étape est appelée *Method suitability* ou applicabilité de la méthode. Le chapitre précise que pour chaque nouveau produit qui sera testé avec la méthode alternative, les essais d'applicabilité décrits dans les chapitres <*51*>, <*61*>, <*62*>, <*63*> et <*71*> doivent être réalisés. Le but est de s'assurer que le signal de la méthode alternative n'est ni augmenté ni diminué par le produit (22).

L'*US Pharmacopeia* recommande que l'applicabilité de la méthode soit démontrée sur **trois essais indépendants**. Pour les méthodes quantitatives, seuls les paramètres d'exactitude et de précision sont exigés. Pour les méthodes qualitatives, le taux de recouvrement suffit (22).

III.2.5. Comparaison de la méthode alternative et de la méthode de référence

Pour finir, la Pharmacopée européenne demande de comparer la méthode alternative et la méthode de référence. Dans l'exemple de la validation de la méthode de bioluminescence, le produit doit être examiné en parallèle avec les deux méthodes au cours de trois essais indépendants sur au moins deux lots différents. Les méthodes sont équivalentes si les résultats des deux méthodes sont corrélés (17).

L'*US Pharmacopeia* demande également que l'équivalence de la méthode alternative et de la méthode de référence soit démontrée, mais il y a cependant une différence majeure : cela se fait avec des microorganismes tests et dans la plupart des cas, en l'**absence de produit**. Quatre options sont envisageables, voir Tableau 9 (22) :

Tableau 9 : Options de démonstration de l'équivalence de deux méthodes, selon le chapitre <*1223*> de l'USP

Options	Démonstration	Comparaison à la méthode de référence	Basée sur des résultats ou conclusions	Nombre de caractéristiques
1. Procédure acceptable	Acceptable	Non	Résultats	Multiple
2. Équivalence des performances	Équivalence	Oui	Résultats	Multiple
3. Équivalence des résultats	Équivalence	Oui	Résultats	Unique
4. Équivalence de la décision	Équivalence	Oui	Conclusions	Unique

III.2.5.i. Option 1 : Procédure acceptable

Il n'y a pas de comparaison directe avec la méthode de référence. Un matériau de référence, dont les propriétés sont connues, est utilisé pour démontrer que **les caractéristiques de performance de la méthode ou les critères d'acceptation sont satisfaits**. Ce matériau de référence peut être un inoculum standard d'un microorganisme spécifié, une quantité de génome bactérien hautement purifié ou encore de l'ATP (22).

III.2.5.ii. Option 2 : Équivalence des performances

Cette option requiert la comparaison des critères de validation entre la méthode alternative et la méthode de référence. Des meilleurs résultats ou des résultats équivalents concernant l'**exactitude**, la **précision**, la **spécificité**, la **limite de détection**, la **limite de quantification**, la **robustesse** et la **précision intermédiaire** doivent être obtenus avec la méthode alternative (22). C'est l'option la plus proche de la qualification des performances de la méthode préconisée par la Pharmacopée européenne (39).

III.2.5.iii. Option 3 : Équivalence des résultats

La méthode alternative et la méthode de référence doivent fournir des **résultats numériques équivalents**. Un intervalle de tolérance doit être établi lors de la comparaison des deux méthodes. Les méthodes alternatives qui ne sont pas basées sur la croissance peuvent générer une plus grande estimation du nombre de cellules qu'une méthode basée sur la croissance qui donne un résultat en UFC. Une courbe de calibration peut alors être utilisée pour démontrer la corrélation entre les deux méthodes dans l'intervalle de spécifications du produit (22).

III.2.5.iv. Option 4 : Équivalence de la décision

Cette option est proche de l'option 3, mais ne requiert pas de résultat numérique, le résultat obtenu est « conforme » ou « non conforme ». La méthode alternative doit démontrer sa non-infériorité par rapport à la méthode de référence. Il est possible de se baser sur les données historiques relatives à la qualité du produit qui ont été établies par la méthode de référence. Des exemples sont ensuite donnés pour démontrer l'équivalence de méthodes quantitatives et qualitatives (22).

Le Tableau 10 résume les différentes étapes de validation d'une méthode alternative en microbiologie.

Tableau 10 : Comparaison des étapes pour la validation des méthodes alternatives en microbiologie, selon la Ph. Eur. et selon l'USP

Pharmacopée européenne	***US Pharmacopeia***
Qualification des équipements et instruments analytiques	
Qualification des performances de la méthode *En l'absence de produit* *Utilisation de microorganismes tests* *Peut requérir une comparaison à la méthode de référence*	**Qualification des performances de la méthode** *En l'absence de produit* *Utilisation de microorganismes tests* *Pas de comparaison à la méthode de référence (en général)*
Validation pour l'usage effectif prévu *Avec le produit* *Avec des microorganismes de référence*	***Method suitability*** *Avec le produit* *Avec des microorganismes de référence*
Essais comparatifs méthode alternative/ méthode de référence *Avec le produit*	**Démonstration de l'équivalence de la méthode alternative et de la méthode de référence** *4 options* *Pas de produit* *Utilisation de microorganismes tests*

Partie III : Cas pratique, vérification d'une méthode de détermination de la biocharge avant stérilisation

I. Suivi de la biocharge d'une solution avant stérilisation : aspects théoriques

I.1. Définitions de la stérilité et de la stérilisation

La stérilité est définie comme « l'**absence de microorganisme viables** » (56), c'est un critère de qualité microbiologique et de sécurité permettant l'administration de médicaments chez l'Homme tout en évitant l'introduction dans l'organisme de microorganismes, pathogènes ou non (49,57). Ce critère est donc une obligation pour les préparations médicamenteuses destinées aux voies parentérales ou ophtalmiques ou encore aux préparations devant être appliquées sur une peau lésée, car les microorganismes pathogènes peuvent être à l'origine d'infections chez le patient pouvant aller jusqu'à la septicémie (57). Les microorganismes peuvent également être la cause d'une dégradation de la préparation médicamenteuse et ainsi altérer sa conservation (58).

Les produits sont rendus stériles par une opération, la stérilisation, dont le but est d' « **éliminer ou tuer tous les microorganismes vivants** portés par des milieux inertes contaminés » (59).

Il est recommandé de stériliser le produit dans son conditionnement final, c'est la **stérilisation terminale**. Les matières premières et articles de conditionnements ne sont pas stériles, mais ont un niveau de contamination le plus bas possible. La **chaleur**, les **rayonnements ionisants** ou les **gaz** sont des méthodes de stérilisation terminale (56).

Lorsque le produit ne peut pas supporter une stérilisation terminale (produit hygro- ou thermosensible, par exemple) il peut être traité par **filtration stérilisante** : le produit est filtré puis réparti de manière aseptique : dans un récipient stérile et dans une Zone d'Atmosphère Contrôlée (ZAC) (56). Les matières premières ne sont pas obligatoirement stériles, voir Figure 7 (57).

Enfin, lorsqu'aucune de ces méthodes de stérilisation ne peut être appliquée au produit, la **préparation aseptique** sera l'unique moyen d'obtenir un produit stérile. Seuls des composants rendus stériles par les méthodes précédemment citées sont utilisés (matières premières, articles de conditionnement, équipements, petit matériel) et ce, dans des conditions strictes afin de maintenir cette stérilité (56).

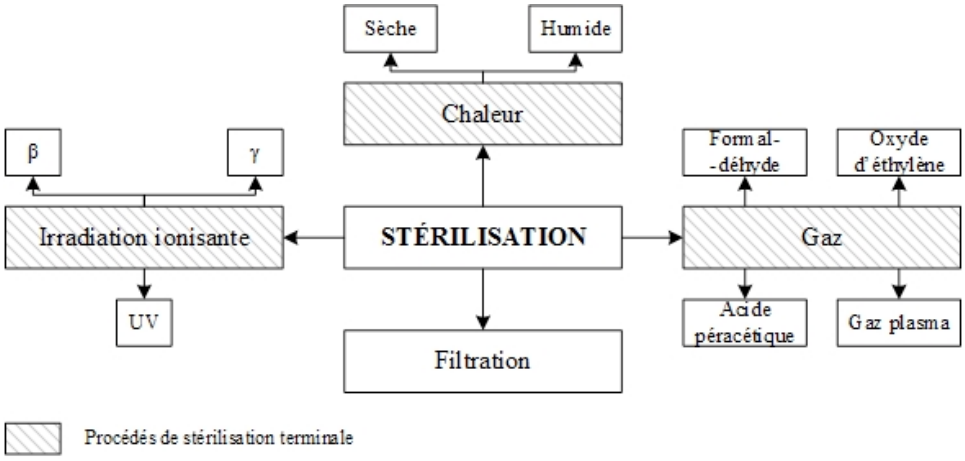


Figure 7 : Méthodes de stérilisation utilisées dans l'industrie pharmaceutique. Adapté de Limayem Blouza, 2013 (57)

I.2. Les différentes méthodes de stérilisation

I.2.1. Stérilisation par la chaleur

Pour les solutions aqueuses, la méthode privilégiée, lorsqu'elle est applicable, est la **stérilisation par la chaleur humide** (passage en autoclave). Le matériel à stériliser est exposé à l'action de la vapeur saturée et sous pression à des conditions de température et de durée déterminées. La chaleur entraîne la dénaturation des protéines bactériennes par hydrolyse partielle des chaînes peptidiques. Les paramètres physiques (température et pression) à l'intérieur de l'autoclave au cours du procédé de stérilisation doivent faire l'objet d'un relevé et être enregistrés. Des sondes sont également placées à l'intérieur de plusieurs récipients représentatifs ainsi qu'aux endroits identifiés comme les plus froids de l'enceinte pour mesurer la température. En effet, il est important que la température soit homogène dans l'ensemble de l'enceinte de stérilisation pour s'assurer que toutes les unités soumises à la stérilisation recevront le traitement requis. Une fois le matériel chargé à l'intérieur de l'autoclave, l'air est évacué au moyen d'une pompe à vide afin d'assurer une bonne diffusion de la vapeur dans l'ensemble de l'enceinte. La charge est ensuite chauffée par la vapeur introduite à haute pression, le temps nécessaire à la stérilisation dépend ensuite de la température utilisée, les conditions de références sont de **121°C pendant 15 minutes** mais, d'autres combinaisons température-durée peuvent être validées. Une fois la stérilisation terminée, la charge est refroidie par évacuation de la vapeur puis séchée, voir Figure 8 (56,57,60).

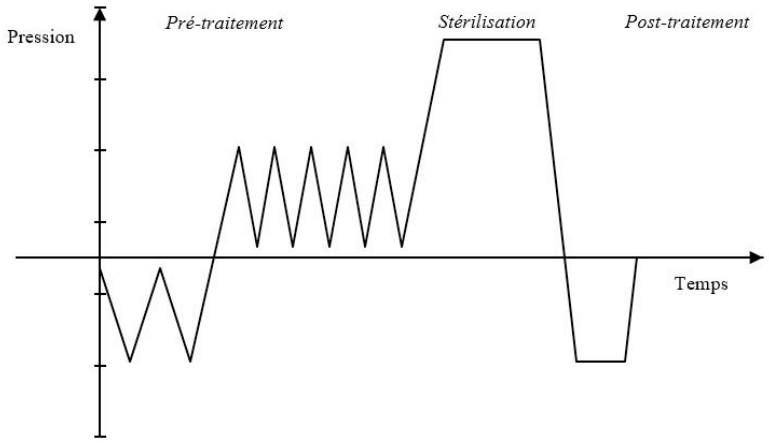


Figure 8 : Diagramme de stérilisation à la chaleur humide (autoclave).

La stérilisation peut aussi s'effectuer par la **chaleur sèche**, elle est réalisée en four ou en étuve à air chaud calorifugé. L'agent stérilisant est le dioxygène, porté à une température élevée, il entraîne l'oxydation des protéines bactériennes. Les conditions de référence de la Pharmacopée européenne sont **160°C pendant au moins 2h**, mais d'autres barèmes peuvent être utilisés s'ils sont validés. Comme pour la stérilisation à la chaleur humide, il est important que la température soit uniforme dans toute l'enceinte lors de la stérilisation, des sondes permettent de relever la température et des enregistrements doivent être réalisés (56,57).

I.2.2. Stérilisation par irradiation ionisante

La stérilisation par **rayonnement ionisant β ou γ** est principalement utilisée pour les dispositifs médicaux ou le matériel médico-chirurgical (seringue, aiguille, articles de pansement, sutures), à travers leur conditionnement définitif. Les rayonnements β sont générés par des accélérateurs d'électrons, le pouvoir pénétrant dépend de l'énergie de l'accélérateur, mais la profondeur de pénétration est limitée par rapport aux rayonnements γ qui sont émis par désintégration d'un isotope radioactif comme le cobalt 60. Ces rayonnements ont la capacité d'ioniser et exciter les atomes constitutifs de la cellule entraînant ainsi la formation de radicaux libres à l'origine d'une altération de l'ADN des microorganismes. La dose de référence permettant d'obtenir l'effet stérilisant est de **25 kGy** et des procédés dosimétriques validés doivent permettre de suivre la dose de rayonnement réellement absorbée par le produit (56,57).

Les **rayonnements UV** sont également utilisés dans l'industrie pharmaceutique, mais uniquement pour stériliser l'atmosphère des enceintes stériles et pour maintenir la stérilité de l'eau lors de son stockage, ils ne constituent pas une méthode de stérilisation des produits (1,57).

I.2.3. Stérilisation par les gaz

La stérilisation par les **gaz** peut être envisagée lorsqu'aucune autre méthode n'est réalisable. Le gaz doit pénétrer le produit et doit ensuite être éliminé. Les gaz utilisés pour la stérilisation sont notamment (56,57) :

- l'oxyde d'éthylène (gaz le plus utilisé)

- l'acide péracétique
- le peroxyde d'hydrogène en phase plasma
- le formaldéhyde

I.2.4. Filtration stérilisante

Cette méthode est adaptée aux liquides monophasiques et aux gaz. Elle est destinée aux produits ne pouvant être stérilisés par stérilisation terminale du fait de leur sensibilité à l'humidité ou à la chaleur. Le produit est filtré sur une membrane antibactérienne de porosité inférieure ou égale à 0.22 µm ou sur un autre type de filtre possédant des propriétés antibactériennes équivalentes puis est recueilli de manière aseptique. Le filtre utilisé doit être reconnu satisfaisant lors d'un essai réalisé avec une suspension de microorganisme approprié. Le microorganisme accepté comme standard par l'industrie pharmaceutique et les fabricants de filtres pour la validation du filtre est *Pseudomonas diminuta*. L'utilisation de ce microorganisme présente plusieurs avantages dont celui de ne pas être pathogène pour l'Homme, ce qui limite le risque biologique. Il est également possible de le cultiver en obtenant des cellules de petite taille et de distribution homogène. La Pharmacopée européenne recommande d'utiliser une suspension d'au moins 10^7 UFC par centimètre carré de surface active de filtration préparée dans du bouillon tryptone-soja. Après passage du filtre, la suspension est recueillie dans des conditions aseptiques puis mise en incubation à 32°C. Il est important que le filtre soit inerte, il ne doit pas entraîner de perte de soluté par adsorption et ne doit pas relarguer de contaminants comme des fibres par exemple. L'intégrité des filtres doit être vérifiée avant et après utilisation au moyen d'essais adaptés tels que le point de bulle, la résistance à la pression ou le taux de diffusion. La filtration présente plus de risques par rapport aux autres méthodes de stérilisation, il est donc possible de positionner en amont du filtre stérilisant un préfiltre antibactérien qui permet de réduire la charge microbienne (1,56,61).

Quel qu'il soit, le procédé de stérilisation choisi doit être validé. En effet, l'industriel est responsable de l'évaluation de la méthode de stérilisation avant sa mise en pratique afin (56) :

- de s'assurer de son efficacité, c'est-à-dire de s'assurer que la méthode permet bien d'obtenir un produit stérile
- du maintien de l'intégrité du produit, car la stérilisation peut entraîner une détérioration du produit

L'évaluation de l'efficacité d'un procédé de stérilisation peut être réalisée au moyen d'indicateurs biologiques de stérilisation. Il s'agit de préparations normalisées de microorganismes constituées par une population de spores bactériennes déposées sur un support inerte approprié comme une bandelette de papier ou une pastille d'inox, voir Tableau 11 (62).

Le choix des microorganismes témoins repose sur trois critères (62):

- la souche sélectionnée doit présenter une résistance importante au procédé de stérilisation comparée à celle des microorganismes susceptibles d'être présents dans le produit

- la souche ne doit pas être pathogène
- la souche doit se développer facilement

Tableau 11 : Souches témoins en fonction du procédé de stérilisation utilisé.

Méthode de stérilisation	Par la vapeur	Par la chaleur sèche	Par irradiation	Par les gaz (oxyde d'éthylène)
Souche témoin	*Geobacillus stearothermiphilus*	*Bacillus atropheus*	*Bacillus pumilis*	*Bacillus atropheus*
Nombre de spores viables par support	$> 5.10^5$	$> 1.10^6$	$> 1.10^7$	$> 1.10^6$

Ces bio-indicateurs doivent être placés aux endroits les moins accessibles à l'agent de stérilisation et, une fois le procédé de stérilisation appliqué, ils doivent être récupérés aseptiquement puis transférés dans des milieux de culture appropriés comme le milieu tryptone-soja et incubés. Si une croissance microbienne est visible (trouble du milieu, filaments, par exemple) une identification bactérienne doit être réalisée. Si la souche identifiée est la souche témoin du bio-indicateur, le procédé de stérilisation est insuffisant (62).

Les études de validation permettent d'associer à chaque procédé de stérilisation un Niveau d'Assurance de Stérilité ou NAS. En effet, il n'est pas possible de vérifier la stérilité de chaque produit soumis à la stérilisation et l'inactivation des microorganismes par des procédés physiques ou chimiques suivant une loi exponentielle, il y a toujours une probabilité statistique qu'un microorganisme survive au procédé de stérilisation. Cette probabilité est fonction (56) :

- du **nombre de microorganismes initialement présents**, de leur type et de leur résistance
- de l'environnement dans lequel ils se retrouvent au moment de la stérilisation

Le NAS exprime le « degré d'assurance avec lequel une population d'articles est rendue stérile par le procédé considéré », un NAS de 10^{-6} correspond à la probabilité d'avoir au plus, un microorganisme viable pour un million d'unités stérilisées du produit final (56).

I.3. Suivi de la biocharge avant stérilisation

La **norme ISO 11137** définit la biocharge comme étant le nombre de microorganismes viables présents sur un produit. Appliquée au contexte de la stérilisation, la biocharge se définit comme le nombre total de microorganismes viables présents sur le produit juste avant sa stérilisation (63).

La contamination microbienne des produits résulte de plusieurs facteurs et notamment (34) :

- les eaux utilisées dans le procédé, dans la formulation ou pour le nettoyage

- les principes actifs pharmaceutiques et les excipients
- les équipements de production
- le personnel
- l'environnement de production

La Pharmacopée européenne dans le chapitre **5.1.1 Méthodes de préparation des produits stériles**, préconise de limiter la charge microbienne avant stérilisation en utilisant des composés dont le niveau de contamination microbienne est suffisamment faible. Elle recommande également la mise en œuvre de contrôles microbiologiques et l'établissement de **limites appropriées** pour les composants comportant des risques de contamination liés à leur origine, leur nature ou leur mode de préparation. En effet, la notion de Niveau d'Assurance de Stérilité précédemment définie permet de comprendre que l'exposition à un procédé de stérilisation correctement validé et contrôlé ne peut apporter à elle seule l'assurance que le produit est stérile. L'efficacité de la stérilisation va notamment dépendre de la **charge microbienne ou biocharge du produit avant sa stérilisation** (56).

La biocharge peut donc présenter un risque pour le patient, d'une part parce que **le procédé de stérilisation risque de ne pas être complètement efficace**, mais également à cause de la **présence possible de matériaux résiduels** à la suite du procédé comme des allergènes, des endotoxines ou des exotoxines. De plus, la prolifération des microorganismes présents dans le produit avant stérilisation peut être à l'origine d'une **altération de la qualité et de la stabilité** (58).

En parallèle de la Pharmacopée européenne, différents textes réglementaires et recommandations apportent des précisions concernant la biocharge :

I.3.1. Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF)

La **Ligne Directrice 1 : Fabrication des médicaments stériles**, rappelle que la garantie de stérilité ne peut uniquement reposer sur le choix de traitement terminal ou le contrôle sur produit fini. Dans cette annexe, il est demandé (1) :

- que la biocharge soit contrôlée avant la stérilisation
- que des limites pour la contamination microbienne immédiatement avant la stérilisation soient fixées en fonction de l'efficacité de la méthode utilisée

Les BPF demandent que la biocharge soit déterminée sur chaque lot produit aseptiquement (1) .

Dans le cadre d'une stérilisation terminale, la biocharge peut être contrôlée à des intervalles préétablis et justifiés si les paramètres de stérilisation dépassent les valeurs stérilisatrices recommandées (surdestruction) (1).

Pour les produits pouvant faire l'objet d'une libération paramétrique, c'est-à-dire les produits dont la libération est fondée sur les données de production et non sur l'essai de stérilité, la biocharge est considérée comme un contrôle en cours de procédé ou ***In Process Control*** (IPC) et doit donc être réalisée sur chaque lot (1).

Si cela se révèle nécessaire, le niveau de contamination en endotoxines dans la biocharge avant stérilisation peut être suivi (1).

Pour finir, l'annexe 1 demande que toutes les solutions, et plus particulièrement les grands volumes de préparations injectables soient filtrées sur un filtre de rétention microbienne, si possible immédiatement avant la répartition (1).

I.3.2. European Medicine Agency (EMA)

La ***Note for guidance on manufacture of the finished product CHMP/QWP/486/95 1996*** recommande d'effectuer la détermination de la biocharge avant filtration stérilisante sans précision de fréquence, mais avec une limite acceptable de **10 UFC/100 mL** (en fonction du volume filtré et du diamètre du filtre). Dans le cas où la biocharge est supérieure à cette limite, la *Guideline* précise qu'un préfiltre de rétention microbienne peut être utilisé afin de réduire le nombre de microorganismes présents dans le produit et ainsi atteindre la limite préconisée. Aucune norme n'est cependant conseillée pour la stérilisation terminale (64).

Le draft de la ***Guideline on the sterilisation of medicinal product, active substance, excipient and primary container*** apporte plus d'information sur la limite acceptable pour la biocharge avant stérilisation, notamment pour la stérilisation terminale par la chaleur sèche ou la chaleur humide avec une limite acceptable de **100 UFC/100 mL**. La limite préconisée pour la biocharge avant filtration stérilisante reste de **10 UFC/100mL** (65).

Concernant la stérilisation par irradiation, la *Guideline* ***The use of ionising radiation in the manufacture of medicinal products*** demande que les limites pour la biocharge avant stérilisation soient fixées en fonction d'essais préalablement menés sur plusieurs lots. Ces essais portent sur la détermination du niveau de contamination microbienne et le type de microorganismes habituellement présents dans le produit et sur le recueil de données de réduction de la biocharge pendant le procédé d'irradiation à différentes doses (66).

I.3.3. Food and Drug Administration (FDA)

Le guide pour l'industrie de 2004 ***Sterile drug product produced by aseptic processing*** recommande d'établir une limite à la biocharge avant filtration stérilisante. En effet, il est rappelé dans cette *Guideline* qu'en plus du risque que le procédé de stérilisation par filtration se révèle insuffisant, la biocharge peut être à l'origine de la présence d'impuretés telles que les endotoxines dans le produit et engendrer une dégradation de celui-ci (67).

I.3.4. United States Pharmacopeia (USP)

L'USP consacre un chapitre complet au suivi de la biocharge : ***<1229.3> Monitoring of bioburden***. La biocharge des produits pharmaceutiques avant stérilisation est décrite comme un élément dont le suivi est essentiel pour apporter l'assurance que les procédés de stérilisation mis en œuvre sont efficaces (58).

Ce chapitre insiste notamment sur le fait qu'il est important de caractériser la biocharge, c'est-à-dire savoir quels sont les microorganismes susceptibles d'être présents dans le produit. En effet, tous ne présenteront pas la même sensibilité face à un procédé de stérilisation donné (58).

Dans le cas d'une stérilisation par la chaleur (humide ou sèche) par exemple, la résistance des formes sporulées au procédé de stérilisation sera plus élevée que la résistance des formes végétatives tandis que dans le cas d'une stérilisation par irradiation, la forme non sporulée présentera une résistance plus importante comparée à la forme sporulée. La connaissance de la nature de la biocharge et de sa cinétique d'inactivation permet donc la mise en œuvre d'un procédé de stérilisation efficace (58).

Dans le cas de la stérilisation par filtration, les capacités de rétention du filtre dépendront de plusieurs facteurs, le premier étant **la taille et le nombre** de microorganismes présents dans le produit en amont de la filtration. Le contrôle de la biocharge avant filtration représente alors un important facteur d'atténuation des risques (58).

Le chapitre <*1229.3*> apporte également des recommandations relatives à l'échantillonnage (58):

- l'analyse de la biocharge devrait être réalisée sur des **échantillons représentatifs** de la production de routine
- la **fréquence d'échantillonnage** quant à elle devrait être établie en se basant sur les critères suivants : « les données antérieures, la variabilité, la taille du lot, les influences relatives au matériel, au procédé et à l'environnement »
- le **laps de temps entre le prélèvement et l'analyse** devrait être déterminé

Dans tous les cas, il est fréquent d'obtenir des résultats différents entre plusieurs échantillons prélevés au sein d'un même lot du fait des différences spatiales et temporelles dans la distribution des microorganismes (58).

L'ensemble de ces textes concerne de façon plus ou moins directe le suivi de la biocharge, le but étant d'obtenir et maintenir un niveau faible en microorganismes avant la stérilisation afin d'augmenter le Niveau d'Assurance de Stérilité (NAS) (68).

La méthode décrite en II.1.1. pour le dénombrement microbien des produits non stériles est adaptée à la détermination de la biocharge avant stérilisation (58).

II. Cas pratique : validation d'une méthode de détermination de la biocharge par filtration sur membrane avant filtration stérilisante

II.1. Présentation du cas pratique

II.1.1. Contexte

La validation analytique présentée dans cette thèse concerne une **méthode de détermination de la biocharge (bioburden) avant filtration stérilisante**.

En effet, le site de Fareva Romainville est spécialisé dans la production d'***Active Pharmaceutical Ingredients*** **(API) ou principes actifs pharmaceutiques stériles** et notamment de corticostéroïdes. Ces matières premières sont produites par une synthèse chimique qui débute par la dissolution d'une poudre de corticostéroïde sous forme non stérile et non micronisée dans un solvant à des conditions de températures et d'agitation appropriées. La solution est ensuite filtrée sur un préfiltre à 0.22 µm puis sur un filtre stérilisant à 0,22 µm, voir Figure 9.

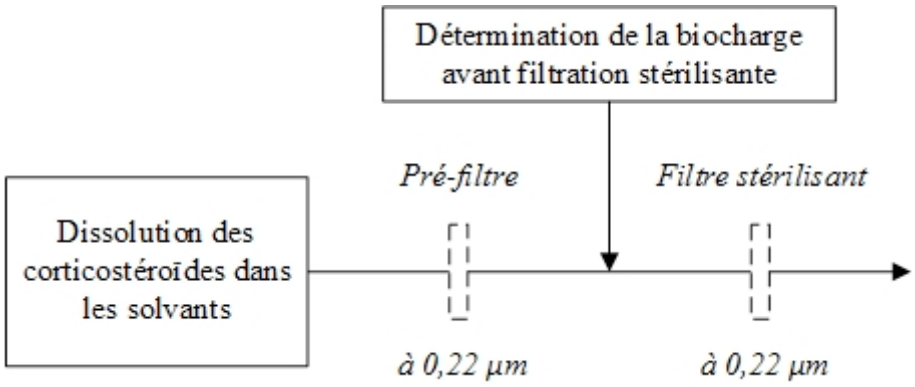


Figure 9 : Prélèvement de l'échantillon pour la détermination de la biocharge avant filtration stérilisante.

La détermination de la biocharge doit être réalisée entre le préfiltre et le filtre. La méthode mise en œuvre est la méthode de référence, décrite par le **chapitre 2.6.12 de la Pharmacopée européenne**, il s'agit donc de vérifier son applicabilité pour les six matières premières produites sur le site.

Historiquement, avant le rachat du Centre de Production de Romainville (CPR) par le groupe Fareva, la détermination de la biocharge était réalisée par incorporation de 1 mL de produit à analyser dans du milieu gélosé aux peptones de caséine et soja ou du milieu Sabouraud dextrosé-gélosé. Cette technique présentait l'inconvénient majeur d'être à l'origine d'une cristallisation de la solution de corticostéroïde dans le milieu gélosé rendant la lecture des boîtes de Petri difficile. En effet, les cristaux présents pouvaient être confondus avec des colonies et ainsi entraîner une surestimation de la biocharge alors que la limite préconisée est relativement faible (10 UFC/100 mL). De plus, pour rendre un résultat pour 100 mL alors que le volume d'échantillon analysé est de 1 mL, le nombre de colonies comptées sur le milieu doit être multiplié par un facteur 100. Cela signifie que pour

que la biocharge avant filtration stérilisante soit conforme aux spécifications prédéfinies, aucune colonie ne devait être détectée sur le milieu.

La technique de filtration sur membrane avait probablement été écartée dans un premier temps du fait de la nature des produits à tester, les membranes en ester cellulose classiquement utilisées ne supportant pas les solvants utilisés pour la dissolution des poudres. Or, plusieurs arguments peuvent orienter vers cette technique. En effet, par le rinçage de la membrane filtrante avec un diluant, la filtration sur membrane permet de contourner un certain nombre de problèmes pouvant être liés à la nature du produit comme une éventuelle activité inhibitrice de la croissance microbienne ou, dans le cas présent, la formation de cristaux dans le milieu de culture. De plus, la filtration sur membrane permet l'analyse d'un plus grand volume d'échantillon : 1 mL dans le cas de l'incorporation contre 100 mL dans le cas de la filtration. La biocharge attendue étant faible (≤ 10 UFC/100 mL), la filtration est plus appropriée.

Des essais réalisés avec de nouvelles membranes à haute résistance chimique ont permis d'envisager à nouveau cette méthode de dénombrement. C'est donc l'essai d'applicabilité de la méthode de dénombrement par filtration sur membrane décrit par la Pharmacopée européenne qui est présenté dans ce cas pratique.

II.1.2. Stratégie de validation

Bien que la nature des solvants, leur proportion, la température de dissolution et la durée de l'agitation diffèrent d'une matière première à une autre, les six produits sont traités selon la même démarche décrite dans le **protocole de validation** de la méthode rédigé et validé avant d'initier toute activité de validation.

La validation est réalisée en deux temps. Dans un premier temps, la méthode doit être validée pour la matière première la plus produite sur le site. Les essais sont réalisés sur **trois lots** différents de cette matière première. Dans un second temps, la validité de la méthode doit être étendue aux cinq autres matières premières, les essais sont réalisés sur **un seul lot** de chaque matière première, voir Tableau 12.

Tableau 12 : Nombre d'essais à réaliser pour la validation de la méthode de détermination de la biocharge.

Matière première 1		
Lot 1	Lot 2	Lot 3
Matière première 2		
Lot 1		
Matière première 3		
Lot 1		
Matière première 4		
Lot 1		
Matière première 5		
Lot 1		
Matière première 6		
Lot 1		

Cela représente au total huit essais réalisés selon des **fiches de test** rédigées et approuvées avant de débuter les activités de validation.

II.1.3. Description des essais réalisés

Lors de chaque essai, il faut déterminer si le produit à analyser présente ou non un effet inhibiteur sur la croissance microbienne. Pour cela, son effet sur cinq souches de référence doit être testé. Il s'agit des souches de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*.

Il a été décidé de réaliser un dupliqua pour chaque filtration.

Pour chaque souche de référence sont donc réalisés :

- deux **essais de validation** : le produit est filtré en présence des souches (au maximum 100 UFC)
- deux **témoins de validation** ou **témoins positifs**: un diluant remplaçant le produit est filtré en présence des souches (au maximum 100 UFC)

Cela permet de comparer le recouvrement microbien et de déterminer si le produit présente une activité antimicrobienne bien que la filtration sur membrane constitue déjà en elle-même une façon de neutraliser l'activité antimicrobienne potentielle.

En parallèle, pour l'ensemble de la manipulation, deux **témoins négatifs** sont réalisés : un diluant remplaçant le produit est filtré puis rincé, il n'y a donc ni produit ni souche. Cela permet de s'assurer que le dénombrement est réalisé dans des conditions permettant d'éviter les contaminations extérieures.

Pour finir, deux **essais « produit »** sont réalisés : le produit est filtré puis rincé, sans ajouter de souches. Cela permet de réaliser l'essai dans les mêmes conditions que le contrôle de routine.

Les essais de validation et témoins de validation sont réalisés sur des échantillons de 10 mL. En routine, le test sera réalisé sur un échantillon de 100 mL, les témoins négatifs et les essais « produit » sont donc réalisés sur des échantillons de 100 mL pour reproduire les conditions réelles de réalisation du contrôle de la biocharge.

II.1.4. Critères d'acceptation

Pour chaque essai, le premier critère à vérifier pour s'assurer de l'applicabilité de la méthode est le **facteur de recouvrement**. Le nombre moyen de colonies obtenu pour chacun des microorganismes de référence ne doit pas différer de plus d'un facteur 2 de la valeur obtenue en l'absence du produit pour le témoin positif c'est-à-dire que le pourcentage de recouvrement doit être compris entre 50 et 200 %. Si ce critère n'est pas respecté, l'activité antimicrobienne doit être neutralisée par un agent neutralisant puis l'essai est à nouveau réalisé pour voir si la neutralisation est efficace, c'est-à-dire si le facteur 2 est respecté.

Les autres critères d'acceptation sont les suivants :

- le nombre de colonies pour chaque souche de référence testée doit être compris entre 10 et 100 UFC

- l'aspect des colonies sur les essais de validation doit être identique à l'aspect des colonies sur les témoins de validation
- aucune croissance microbienne ne doit être observée sur le témoin négatif
- le nombre moyen de colonies sur l'essai « produit » doit être inférieur à 10 UFC pour 100 mL

Il est également essentiel de vérifier :

- que les milieux de culture utilisés sont **stériles** et **fertiles** et qu'ils sont utilisés avant la date de péremption
- que le diluant de rinçage est stérile, qu'il ne présente pas de **propriétés inhibitrices** et qu'il est utilisé avant la date de péremption
- que les souches utilisées ont fait l'objet d'une numération à réception, qu'elles sont utilisées dans les délais requis après reconstitution et qu'elles ont été utilisées avant la date de péremption
- que les équipements utilisés ont fait l'objet d'une **qualification** et que la qualification est conforme au moment de la réalisation des essais

Pour chaque lot testé, afin de vérifier si les critères d'acceptation sont respectés les essais sont réalisés selon les fiches de test résumées dans le Tableau 13. Ces fiches devront être complétées avec les données nécessaires au fur et à mesure de l'exécution des tests. Elles seront ensuite vérifiées par une personne techniquement compétente puis revues par le service qualification/validation.

Tableau 13 : Plan des essais réalisés pour la validation de la méthode de détermination de la biocharge.

N° de la fiche de test	Titre de la fiche de test		Objectifs	Critères d'acceptation
01	Vérification de la conformité des produits utilisés pour l'essai de validation		Vérifier la conformité des produits utilisés pour l'étude de validation	Chaque produit doit avoir un n° de contrôle qui atteste de sa validation à réception et être utilisé avant sa péremption
02	Vérification de la conformité du matériel utilisé pour l'essai de validation		Vérifier la conformité du matériel utilisé pour l'étude de validation	L'ensemble du matériel est qualifié
03	Essai pour la validation de la méthode de détermination de la biocharge	Préparation de l'échantillon	S'assurer que la validation de la méthode de détermination de la biocharge est réalisée conformément au protocole préétabli	Les étapes sont réalisées conformément au protocole préétabli et les différents paramètres sont respectés
		Préparation des souches de référence		
		Réalisation des essais de validation		
		Réalisation des témoins de validation		
		Réalisation des témoins négatifs		
		Réalisation des essais « produit »		
04	Applicabilité de la méthode : résultats et interprétation		Vérifier si la méthode de détermination de la biocharge est validée et pourra être utilisée en routine	Les critères d'acceptation définis en sont respectés
05	Fiche récapitulative des anomalies			

Un **rapport de validation intermédiaire** est émis pour chaque matière première testée puis un **rapport de validation final** résumant les résultats obtenus et synthétisant les anomalies rencontrées pendant la période de validation permet de conclure sur le statut de la méthode de détermination de la biocharge.

II.2. Validation de la méthode de détermination de la biocharge

II.2.1. Prérequis à la validation de la méthode de détermination de la biocharge

II.2.1.i. Validation des milieux de culture et diluants

Pour la validation de la méthode de détermination de la biocharge, les milieux suivants ont été utilisés :

- milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja pour le DGAT
- milieu Sabouraud dextrosé-gélosé pour le DMLT
- diluant Pharmacopée pH 7 avec Neutralisant (DNP)

Ces milieux ont été validés à réception selon les procédures de contrôle en vigueur au Laboratoire de Contrôle Qualité du site de Fareva Romainville. Ces procédures de contrôle s'appuient sur les chapitres **2.6.1 Stérilité** et **2.6.12 Contrôle microbiologique des produits non stériles : essais de dénombrement microbien**, de la Pharmacopée européenne (41,47). En effet, ces milieux et diluants doivent être testés afin de démontrer :

- qu'ils sont stériles
- qu'ils sont fertiles, dans le cas des milieux de culture
- qu'ils ne présentent pas de propriétés inhibitrices, dans le cas des diluants

La composition théorique de ces milieux et du diluant est précisée en ANNEXE 1.

II.2.1.ii. Stérilité des milieux de culture et diluants

La stérilité des milieux de culture gélosés est vérifiée sur deux échantillons, ici deux boîtes de milieu de diamètre 90 mm. Une boîte est incubée à 20-25°C et une autre à 30-35°C pendant 14 jours. Les milieux sont stériles si aucune croissance microbienne n'est détectée après la période d'incubation.

Pour les diluants, la stérilité est vérifiée sur deux échantillons, ici deux flacons de 90 mL. La totalité d'un conditionnement est filtrée sur une membrane de porosité 0,22 µm. La membrane est rincée deux fois avec 100 mL d'eau stérile puis transférée sur un milieu aux peptones de caséine et soja et incubée 3 à 5 jours à 30-35°C pour la recherche de bactéries ou sur un milieu Sabouraud dextrosé-gélosé et incubée 5 à 7 jours à 20-25°C pour la recherche de moisissures et levures. Les diluants sont stériles si aucune croissance microbienne n'est détectée sur la membrane après la période d'incubation.

(a) Fertilité des milieux de culture

La fertilité des milieux de culture gélosés est vérifiée par **étalement en surface** d'un inoculum d'au maximum 100 UFC. Les microorganismes utilisés et les conditions d'incubation sont précisés dans le Tableau 14. Pour chaque souche, deux échantillons, ici deux boîtes de milieu de diamètre 90 mm, sont ensemencés.

En parallèle, un dénombrement témoin est réalisé. Pour chaque souche utilisée, un étalement en surface d'un inoculum d'au maximum 100 UFC est réalisé, en double, sur des boîtes de milieux précédemment validées.

Tableau 14 : Microorganismes et conditions d'incubation pour vérifier la fertilité des milieux de culture.

Microorganisme	Fertilité des milieux	
	Milieu gélosé aux peptones de caséine et soja	Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé
Staphylococcus aureus *Pseudomonas aeruginosa* *Bacillus subtilis*	30-35 °C ≤ 3 jours	/
Candida albicans *Aspergillus brasiliensis*	30-35°C ≤ 5 jours	20-25°C ≤ 5 jours

Sur chaque boîte, le nombre de colonies doit être compris entre 10 et 100 UFC. Les milieux sont fertiles si le dénombrement des colonies obtenu sur le milieu témoin et sur le milieu testé ne diffère pas de plus d'un facteur 2.

(b) Absence de propriétés inhibitrices des diluants

L'absence de propriétés inhibitrices des diluants est vérifiée par **inoculation** d'au maximum 100 UFC dans le diluant. Les souches sont laissées 45 minutes au contact du diluant puis le flacon est filtré sur une membrane de porosité 0,22 µm. La membrane est rincée deux fois avec 100 mL d'eau stérile puis transférée sur un milieu aux peptones de caséine et soja et incubée. Les microorganismes utilisés et les conditions d'incubation sont précisés dans le Tableau 15. Pour chaque souche, deux échantillons, ici deux flacons de 90 mL, sont ensemencés.

En parallèle, un dénombrement témoin est réalisé. Pour chaque souche utilisée, une filtration sur une membrane de porosité 0,22 µm d'un inoculum (diluant précédemment validé par exemple) contenant au maximum 100 UFC est réalisée, en double. La membrane est rincée deux fois avec 100 mL d'eau stérile puis transférée sur un milieu aux peptones de caséine et soja et incubée.

Tableau 15 : Microorganismes et conditions d'incubation pour vérifier l'absence de propriétés inhibitrices du DNP.

Microorganisme	Absence de propriétés inhibitrices
	DNP
Staphylococcus aureus *Pseudomonas aeruginosa* *Bacillus subtilis*	30-35 °C ≤ 3 jours
Candida albicans *Aspergillus brasiliensis*	30-35 °C ≤ 5 jours

Sur chaque boîte, le nombre de colonies doit être compris entre 10 et 100 UFC. Le diluant ne présente pas de propriétés inhibitrices si le dénombrement des colonies obtenu sur le milieu témoin et sur le milieu testé ne diffère pas de plus d'un facteur 2.

II.2.1.iii. Validation des microorganismes tests

Les souches utilisées sont celles décrites par la Pharmacopée européenne, voir Tableau 16.

Tableau 16 : Références des microorganismes tests utilisés pour la validation de la méthode de détermination de la biocharge.

Germes	Références
DGAT	
Staphylococcus aureus	NCTC 10788
Pseudomonas aeruginosa	NCTC 12924
Bacillus subtilis	NCTC 10400
DMLT	
Candida albicans	NCPF 3179
Aspergillus brasiliensis	NCPF 2275

NCTC : National Collection of Type Culture
NCPF : National Collection of Pathogenic Fungi

Les suspensions sont reconstituées à partir de petites billes hydrosolubles contenant un nombre précis d'UFC (Bioball® des laboratoires Biomérieux). Le contrôle de ces Bioball® consiste à réaliser une numération.

Les Bioball® utilisées au laboratoire contiennent 550 UFC, elles doivent être réhydratées par un liquide de réhydratation spécifique de 1,1 mL. Un étalement en surface est réalisé, en double, avec 100 µL de la suspension ainsi reconstituée sur un milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja.
Les boîtes sont ensuite incubées :

- 24h à 37 ± 1°C, pour *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*
- 24 à 48h à 37 ± 1°C, pour *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*

Les Bioball® sont acceptées si le dénombrement obtenu est compris dans l'intervalle de mesure fourni par le certificat de contrôle du fabricant.

II.2.1.iv. Contrôle de l'environnement de travail

Toutes les manipulations décrites sont réalisées sous un **Poste de Sécurité Microbiologique** (PSM). Le PSM est une enceinte ventilée destinée à assurer à la fois la protection du manipulateur et de l'environnement vis-à-vis des agents biologiques pathogènes et la réalisation des manipulations microbiologiques dans des conditions aseptiques. La norme EN 12469 définit trois types de PSM en

fonction du niveau de protection atteint. Le PSM de type II utilisé ici est une enceinte partiellement ouverte sur le devant, elle assure (69) :

- la protection du **manipulateur** : l'air du laboratoire est aspiré par l'ouverture du PSM puis est repris par des orifices situés en avant du plan de travail, créant ainsi une « barrière » empêchant la sortie des contaminants vers le manipulateur
- la protection de la **manipulation** : par un flux d'air descendant unidirectionnel filtré par un filtre à très haute efficacité
- la protection de l'**environnement** : l'air de l'enceinte est récupéré par des orifices situés au niveau du plan de travail. Il est ensuite conduit dans la partie haute du PSM, une partie de ce flux est ensuite extraite à l'extérieur du PSM après filtration à très haute efficacité tandis que l'autre partie est réintroduite dans le volume de travail après filtration à très haute efficacité

Après sa qualification initiale, le PSM doit faire l'objet d'un **contrôle annuel** dont le but est de vérifier la **linéarité du flux d'air** dans l'enceinte de travail, l'**intégrité des filtres** à très haute efficacité et le **taux de brassage**. Cela permet de s'assurer que les objectifs de protection sont atteints. Le PSM fait également l'objet d'un **contrôle mensuel** qui est de la responsabilité de ses utilisateurs afin de s'assurer de la qualité microbiologique de l'air et des surfaces et de la qualité particulaire. Le PSM est une Zone à Atmosphère Contrôlée (ZAC) assimilée à une classe A ce qui signifie que les résultats des contrôles doivent répondre aux spécifications de la classe A définies par les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), voir Tableau 17 et Tableau 18 (1). Avant toute manipulation, il est de la responsabilité du manipulateur de s'assurer que ce contrôle a été réalisé.

Tableau 17 : Limites microbiologiques recommandée d'une zone de classe A, selon les BPF.

Classe A	
Qualité microbiologique	
Air	**Surface**
< 1 UFC/m^3	< 1 UFC/ gélose de 55 mm de diamètre

Tableau 18 : Spécifications pour la qualité particulaire d'une zone de classe A, selon les BPF.

Classe A			
Qualité particulaire			
Au repos		**En activité**	
Nombre maximal de particules ≥ 5 µm	**Nombre maximal de particules ≥ 0,5 µm**	**Nombre maximal de particules ≥ 5 µm**	**Nombre maximal de particules ≥ 0,5 µm**
20	3 520	20	3 520

(a) Contrôle de la qualité microbiologique de l'air et des surfaces

Les milieux utilisés pour le contrôle sont des milieux nutritifs non spécifiques type trypcase soja gélosé. Ils doivent avoir fait l'objet d'un contrôle à réception afin de s'assurer de leur stérilité et de leurs propriétés nutritives, comme décrit en II.2.1.i.

Le contrôle de la qualité microbiologique de l'air et des surfaces est réalisé en suivant les principes d'évaluation de la biocontamination décrits par la **norme ISO 14698-1 : 2003 « Salles propres et environnements maîtrisés apparentés - Maîtrise de la biocontamination - Partie 1 : Principes généraux et méthodes »** (70). Pour le contrôle de l'air, un volume d'1 m^3 d'air est prélevé dans le volume de travail. Pour le contrôle des surfaces, le contrôle est effectué par application d'une gélose Countact® au centre du plan de travail. Les milieux sont ensuite incubés à 30-35°C pendant 3 à 5 jours.

(b) Contrôle de la qualité particulaire

Le nombre de points de prélèvement est fonction de la surface de la zone à contrôler. Selon la **norme ISO 14644-1 : 1999 « Salles propres et environnements maîtrisés apparentés - Partie 1 : Classification de la propreté particulaire de l'air »** (71), le nombre de points de prélèvement est déterminé selon la formule :

$$Nombre\ de\ points\ de\ prélèvement = \sqrt{Surface\ en\ m^2}$$

Les points doivent être répartis de façon uniforme dans l'ensemble de la zone. La surface du PSM est de 0,55 m^2, il n'y a donc qu'un seul point de prélèvement à réaliser. Dans ce cas, trois comptages sont réalisés à ce point (centre du plan de travail), à chaque comptage, un volume de 1 $pied^3$ est prélevé. Le résultat rendu est la limite supérieure de l'intervalle de confiance de la moyenne des comptages.

II.2.1.v. Cartographie des enceintes climatiques : étuves

La cartographie des étuves doit être réalisée au minimum tous les deux ans. Elle est effectuée aux températures d'utilisation en routine soit 20-25°C et 30-35°C dans le cas présent. Le but est de s'assurer que la température est homogène en tout point de l'étuve.

La cartographie des enceintes climatiques suit la **norme FD X15-140 « Mesure de l'humidité de l'air - Enceintes climatiques et thermostatiques - Caractérisation et vérification »** (72). Des sondes étalonnées sont placées à différents points de l'enceinte. Pour des enceintes comme celles utilisées dont le volume est inférieur à 2 m^3, neuf sondes sont réparties dans l'enceinte : une à chacun des angles et une au centre, comme indiqué dans la Figure 10.

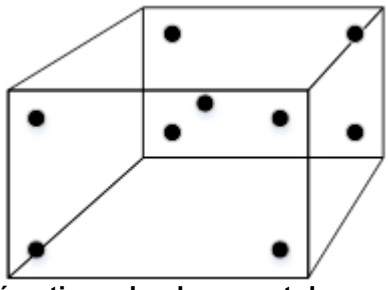


Figure 10 : Représentation schématique du placement des sondes de suivi de la température lors de la cartographie d'une enceinte climatique.

Un relevé de température est effectué toutes les minutes pendant au moins deux heures et demie avec ouverture programmée de l'enceinte de deux minutes. Les données extraites sont ensuite analysées pour s'assurer que tous les points respectent les spécifications définies.

De plus, les étuves font l'objet d'un suivi en continu de leur température afin de s'assurer que les températures d'incubation sont respectées.

II.2.1.vi. Qualification et étalonnage des appareils de mesure

Une balance et un thermomètre sont nécessaires à la préparation de l'échantillon. Une micropipette est également utilisée pour l'inoculation des souches. Ces instruments de mesure doivent faire l'objet d'un contrôle tous les six mois pour la balance et la micropipette et tous les ans pour le thermomètre. Cette vérification est effectuée par une société extérieure, mais il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer qu'elle a bien été effectuée avant d'utiliser le matériel.

II.2.2. Essais mis en œuvre pour la validation de la méthode de détermination de la biocharge

II.2.2.i. Préparation de l'échantillon de produit

Les solutions de corticostéroïdes utilisées pour la validation ont été préparées au Laboratoire de Contrôle Qualité en suivant les conditions et les proportions utilisées en production pour réaliser la dissolution des poudres, voir Tableau 19.

Tableau 19 : Conditions et proportions pour la réalisation des échantillons de produits.

Poudre	Produit 1	Produit 2	Produit 3	Produit 4	Produit 5	Produit 6
Solvant (V : Volume de solvant par rapport à la quantité de poudre)	Solvant 1 12 V ± 1.2	Solvant 3 11.4 V	Solvant 1	Solvant 1 6.3 V	Solvant 4 2 V ± 0.2	Solvant 1 16.15 V
	Solvant 2 3 V ± 0.3			Solvant 2 0.7 V		Solvant 2 2.85 V
Température (°C)	70 ± 2	30 ± 5	60 ± 5	39 ± 3	entre 55 et 60	60 ± 5

Pour chacun des produits pour lesquels la méthode doit être validée, 360 mL d'échantillon doivent être préparés :

- **essais de validation** : l'essai étant réalisé en double, il est nécessaire de prévoir 20 mL d'échantillon pour chaque souche testée, soit 100 mL
- **essais « produit »** : ces essais reproduisent les conditions réelles du contrôle soit 100 mL d'échantillon filtré sur une membrane qui sera transféré sur un milieu aux peptones de caséine et de soja et 100 mL d'échantillon filtré sur une membrane qui sera transféré sur un milieu Sabouraud dextrosé-gélosé
- une marge de 20 % a été prévue

Exemple du Produit 1 :

- Solvant 1 : 12 ± 1.2 V
- Solvant 2 : 3 ± 0.3 V

Température : 70 ± 2°C, sous agitation jusqu'à dissolution complète.

1) Peser 25 g de matière première dans un récipient stérile de contenance 500 mL
2) Ajouter progressivement 300 mL du Solvant 1 (12 V X 25 g = 300 mL de Solvant 1)
3) Ajouter 75 mL du Solvant 2 (3 V X 25 g = 75 mL de Solvant 2)
4) Placer au bain-marie préalablement chauffé à 70 ± 2°C et agiter de façon continue jusqu'à dissolution complète
5) Vérifier le pH à titre indicatif

II.2.2.ii. Préparation des suspensions de microorganismes tests

Les suspensions de microorganismes tests ont été préparées par réhydratation d'une Bioball® avec un liquide spécifique. La Bioball® doit être plongée délicatement dans le liquide puis le tube est agité trente secondes pour homogénéiser la suspension. Ainsi préparées, les suspensions ont une concentration d'environ 550 UFC/mL. Elles doivent être homogénéisées cinq secondes avant chaque utilisation et doivent être utilisées dans les deux heures suivant leur reconstitution ou dans les huit heures si elles ont été conservées entre + 2 et + 8°C.

II.2.2.iii. Vérification de l'applicabilité de la méthode de détermination de la biocharge

Pour chacun des essais décrits, les membranes filtrantes utilisées sont des membranes en polypropylène à haute résistance chimique, adaptées à la filtration des solvants. La Pharmacopée européenne préconise d'utiliser des membranes dont le diamètre des pores est d'au maximum 0,45 µm. Un diamètre inférieur a été choisi (0,22 µm) afin de reproduire les conditions de la filtration stérilisante mise en œuvre en production.

(a) Essais de validation : produit et souches

Pour chaque microorganisme test, l'essai a été réalisé en double.

Un volume de 10 mL d'échantillon a été filtré sur une membrane à haute résistance chimique puis rincé immédiatement :

- tout d'abord avec 10 mL de DNP contenant 100 µL de la suspension de microorganismes précédemment préparée (550 UFC/mL), soit 55 UFC
- puis avec 10 mL de DNP afin d'assurer une répartition homogène des microorganismes sur la membrane filtrante

Il a été choisi de ne pas inoculer les souches directement dans l'échantillon contenant des solvants. Le potentiel effet inhibiteur du produit est ici éliminé par la

filtration sur membrane et le but est de vérifier que les conditions de réalisation de la méthode permettent le dénombrement des colonies.

La membrane est ensuite transférée de façon aseptique sur un milieu gélosé, voir Figure 11.

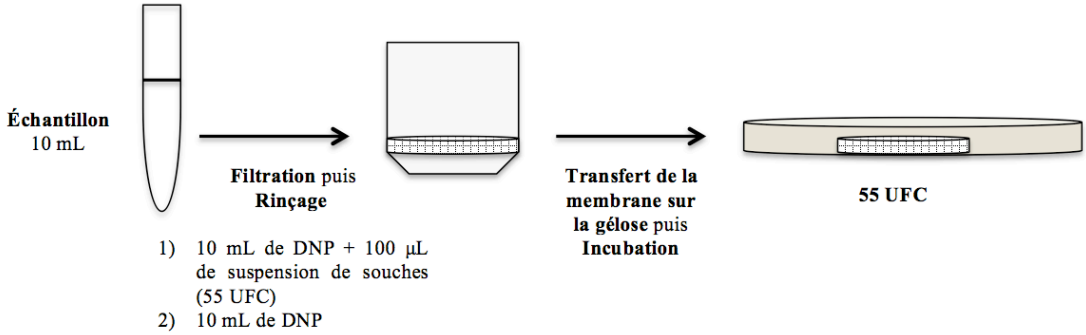


Figure 11 : Essai de validation : filtration du produit et des souches.

En fonction de la souche testée, le milieu de culture et les conditions d'incubation sont précisés dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Conditions d'incubation en fonction du microorganisme testé.

Germe	Milieu d'incubation	Température incubation	Durée incubation
Staphylococcus aureus	Gélose taux peptones de caséine et soja	30-35 °C	≤ 3 jours
Pseudomonas aeruginosa	Gélose taux peptones de caséine et soja	30-35 °C	≤ 3 jours
Bacillus subtilis	Gélose taux peptones de caséine et soja	30-35 °C	≤ 3 jours
Candida albicans	Gélose Sabouraud	20-25 °C	≤ 5 jours
Aspergillus brasiliensis	Gélose Sabouraud	20-25 °C	≤ 5 jours

(b) Témoins de validation : sans produit, mais avec DNP et souches

Pour chaque microorganisme test, l'essai a été réalisé en double.

Un volume de 10 mL de DNP a été filtré sur une membrane à haute résistance chimique puis rincé immédiatement :

- tout d'abord avec 10 mL de DNP contenant 100 µL de la suspension de microorganisme précédemment préparée (550 UFC/mL), soit 55 UFC

- puis avec 10 mL de DNP afin d'assurer une répartition homogène des microorganismes sur la membrane filtrante

La membrane est ensuite transférée de façon aseptique sur un milieu gélosé, voir Figure 12.

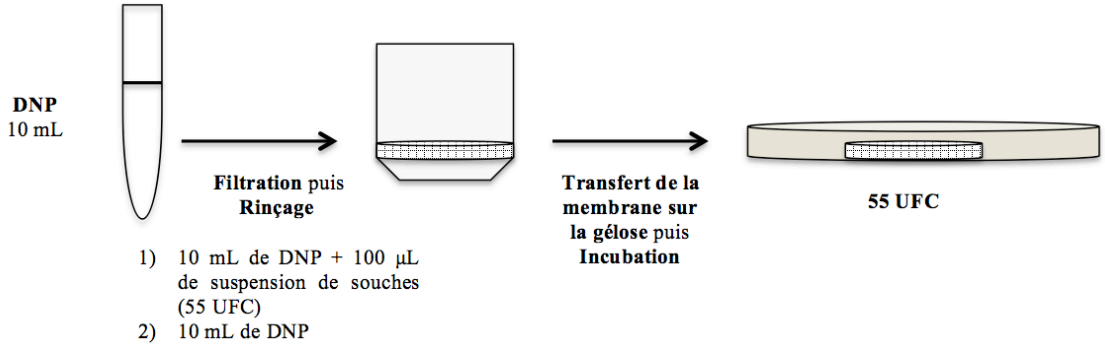


Figure 12 : Témoins de validation : filtration du DNP des souches, en l'absence de produit.

En fonction de la souche testée, le milieu de culture et les conditions d'incubation sont précisés dans le Tableau 20.

(c) Témoins négatifs : ni produit ni souche

Afin de vérifier les conditions opératoires, deux témoins négatifs ont été réalisés : le premier pour détecter la présence éventuelle de bactéries, le second pour détecter la présence éventuelle de moisissures et levures. Un volume de 100 mL de DNP a été filtré deux fois puis la membrane a été transférée sur un milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja puis incubée à 30-35°C pendant 3 à 5 jours. La même manipulation a été reproduite, mais cette fois-ci, la membrane a été transférée sur un milieu Sabouraud dextrosé-gélosé puis incubée à 20-25°C pendant 5 à 7 jours, voir Figure 13.

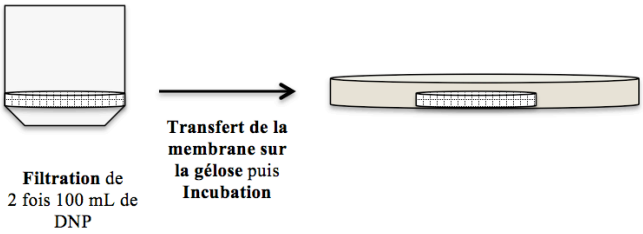


Figure 13 : Témoins négatifs : filtration de DNP, ni produit, ni souche.

(d) Essais "produit"

Deux échantillons de produit ont été filtrés. Un premier volume de 100 mL a été filtré puis rincé avec 100 mL de DNP deux fois, la membrane a été transférée sur un milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja puis incubée à 30-35°C pendant 3 à 5 jours. La même manipulation a été reproduite, mais cette fois-ci, la membrane a été transférée sur un milieu Sabouraud dextrosé-gélosé puis incubée à 20-25°C pendant 5 à 7 jours, voir Figure 14.

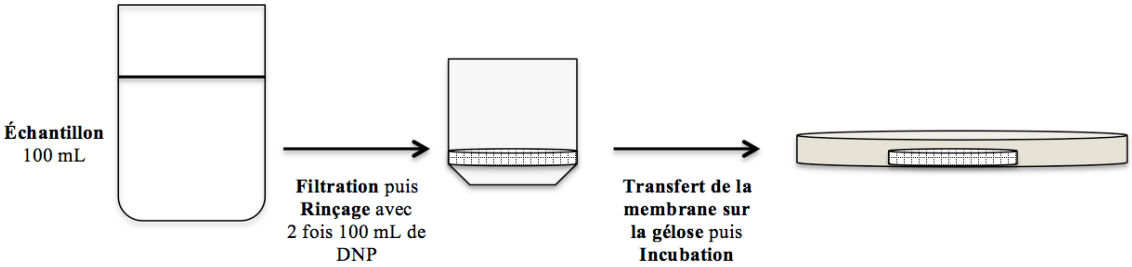


Figure 14 : Essais « produit » : filtration du produit, sans souche.

II.2.3. Résultats

II.2.3.i. Critères pris en compte pour l'interprétation des résultats

La lecture des boîtes incubées a été réalisée chaque jour pendant trois jours pour le Dénombrement des Germes Aérobies Totaux (milieu aux peptones de caséine et soja) et pendant cinq jours pour le Dénombrement des Moisissures et Levures Totales (milieux Sabouraud dextrosé-gélosé).

Pour les boîtes correspondant aux essais et témoins de validation, seuls les microorganismes de la souche d'ensemencement ont été dénombrés, c'est-à-dire que seuls les microorganismes tests ont été pris en compte pour le dénombrement lors de la lecture journalière et pour le calcul du facteur de recouvrement.

Les boîtes de Petri ont été considérées comme interprétables pour un nombre de colonies compris entre 10 et 100 UFC, en-deçà ou au-delà de cette numération ou si le nombre de colonies ne peut être clairement dénombré, il a été indiqué « NI » pour « Non interprétable » sur la fiche de test.

En cas de numération identique deux jours successifs, il a été estimé qu'il n'y aurait pas de nouvelle croissance microbienne. La lecture a été suspendue et il a été indiqué « NA » les jours suivants pour « Non Applicable » sur la fiche de test.

La durée d'incubation a été vérifiée avant de conclure sur les résultats obtenus (inférieure ou égale à trois jours pour les souches bactériennes et inférieure ou égale à cinq jours pour les levures et les moisissures).

Le nombre moyen d'UFC pour chaque souche a été calculé à partir des lectures finales (dernier jour de lecture dans le tableau des résultats).

II.2.3.ii. Conformité des milieux de culture, diluants et microorganismes tests utilisés

Le premier aspect de la validation de la méthode de détermination de la biocharge consistait à s'assurer que les milieux de cultures, diluants et microorganismes tests utilisés :

- avaient fait l'objet d'un contrôle à réception, pour cela, ils devaient être enregistrés au Laboratoire de Contrôle Qualité sous un numéro de contrôle
- étaient utilisés avant leur date de péremption

L'ensemble de ces informations a été reporté dans la fiche de test n° 1 (voir ANNEXE 2). Il en ressort que :

- tous les produits utilisés pour la validation de la méthode de détermination de la biocharge ont été **validés à réception**
- ces produits ont été **utilisés avant leur date de péremption** à l'exception des milieux Sabouraud dextrosé-gélose utilisés lors de l'essai de validation n°2 qui arrivaient à péremption avant la date de fin d'incubation. Une fiche d'anomalie a été ouverte, et la fertilité des milieux a fait l'objet d'un recontrôle avec les souches *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*. Le milieu étant fertile, son utilisation après sa date de péremption n'a pas d'incidence sur les résultats obtenus lors de l'essai n°2 et l'anomalie a pu être clôturée.

II.2.3.iii. Conformité des équipements utilisés : PSM, étuves, balance, thermomètre et micropipette

L'utilisation d'équipements qualifiés et faisant l'objet de contrôles réguliers est un prérequis indispensable pour la validation de la méthode. Tout comme l'utilisation de milieux de culture, diluants et microorganismes tests conformes, cela participe à l'obtention de résultats fiables.

Ces données ont été renseignées dans la fiche de test n°2, (voir ANNEXE 3). Il en ressort que l'ensemble des équipements :

- a fait l'objet d'une **qualification initiale**
- a fait l'objet d'une **vérification à intervalles réguliers** : dans le mois précédant les essais pour le PSM, dans les deux ans précédant les essais pour les étuves à 20-25°C et 30-35°C, au cours de l'année pour le thermomètre et dans les six mois précédents les essais pour la balance et la micropipette.

II.2.3.iv. Respect de la méthodologie de réalisation des essais décrite dans le protocole de validation

Lors de la réalisation de chaque essai, la méthodologie décrite par le protocole a dû être respectée concernant :

- la préparation de l'échantillon : respect des proportions poudres/solvants et des températures de dissolution
- la préparation des microorganismes tests : respect du délai d'utilisation après reconstitution de la suspension, c'est-à-dire inférieur à deux heures ou compris entre deux et huit heures si la suspension a été conservée entre +2°C et +8°C
- la réalisation des essais et témoins validation, des témoins négatifs et des essais « produit »

Des check-lists ont été remplies au fur et à mesure de la réalisation des essais sur la fiche de test n°3 (voir ANNEXE 4) et il en ressort que la méthodologie décrite a bien été suivie.

II.2.3.v. Interprétation des résultats

Pour chaque essai, le résultat du dénombrement journalier des colonies a été reporté sur la fiche de test n°4 (voir ANNEXE 5). Le détail du dénombrement journalier pour chaque souche et chaque essai figure en ANNEXE 6. Il est à noter que certaines boîtes sont marquées comme étant non interprétables (NI) :

- essai n°4 : pour la souche *P. aeruginosa*, une boîte essai de validation est non interprétable dès le premier jour de lecture
- essai n°6 : pour la souche *B. subtilis*, une boîte essai validation est non interprétable au troisième jour d'incubation, avec lecture non réalisée les deux jours précédents
- essai n° 8 :
    - pour la souche *P. aeruginosa*, au deuxième jour d'incubation, les deux boîtes essai validation sont non interprétables mais la lecture a été possible le jour précédent
    - pour la souche *B. subtilis*, au deuxième jour d'incubation, les deux boîtes essai validation sont non interprétables mais la lecture a été possible le jour précédent, au troisième jour d'incubation les deux boîtes témoins de validation ne sont plus interprétables mais la lecture a été possible les deux jours précédents

Sur ces boîtes, la souche semble avoir envahi la membrane, le contour des colonies n'est pas net, elles ne peuvent donc pas être dénombrées. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce phénomène :

- la mobilité des souches *P. aeruginosa* et *B. subtilis* grâce à leur ciliature
- un effet propre au produit analysé
- un rinçage insuffisant de la membrane
- une membrane transférée sur le milieu gélosé encore mouillée (filtration insuffisante)

Cependant, les essais n'ont pas eu à être répétés. En effet, pour les essais n° 4 et n° 6, une seule boîte est concernée et le dénombrement a pu être réalisé sur la seconde boîte, c'est donc le dénombrement réalisé sur la seconde boîte qui est pris en compte pour l'interprétation des résultats. Concernant l'essai n° 8, pour les essais de validation (souches *P. aeruginosa* et *B. subtilis*) la lecture a pu être réalisée au premier jour d'incubation et pour les témoins de validation (souche *B. subtilis*) la lecture a pu être réalisée au premier jour et au deuxième jour d'incubation, ce sont donc les derniers résultats interprétables qui sont retenus pour l'interprétation des résultats.

En prenant en compte ces éléments, il ressort que pour chaque essai réalisé, **le nombre de colonies de microorganismes tests est compris entre 10 et 100 UFC**, qu'il s'agisse des essais de validation ou des témoins de validation. Globalement, les nombres de colonies comptées lors des essais de validation et des témoins de validations sont de 31 à 51 UFC par boîte pour *S. aureus* (Figure 15), 29 à 53 UFC par boîte pour *P. aeruginosa* (Figure 16), 30 à 54 UFC par boîte pour *B.*

subtilis (Figure 17), 31 à 51 UFC par boîte pour *C. albicans* (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) et de 20 à 40 UFC par boîte pour *A. brasiliensis* (Figure 19)

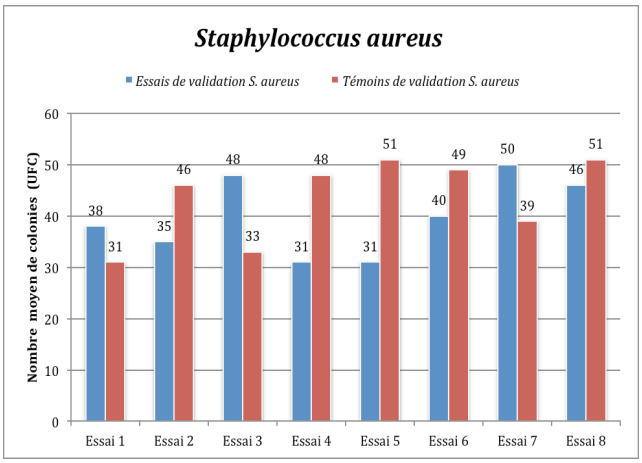


Figure 15 : Nombre moyen d'UFC pour la souche *S. aureus*

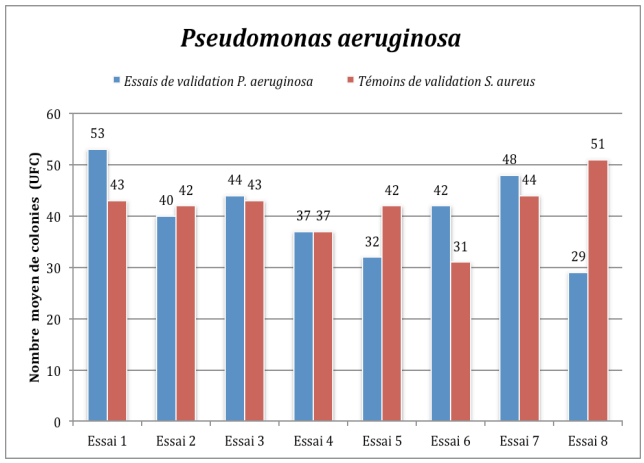


Figure 16 : Nombre moyen d'UFC pour la souche *P. aeruginosa*

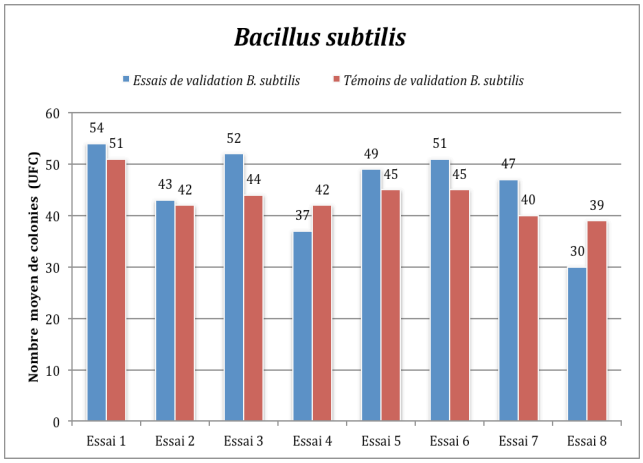


Figure 17 : Nombre moyen d'UFC pour la souche *B. subtilis*

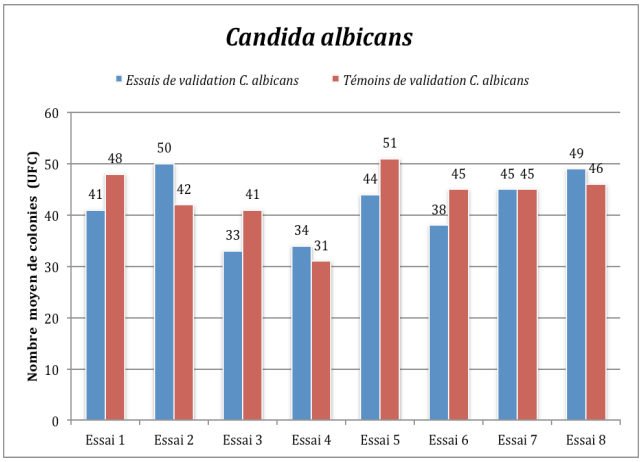


Figure 18 : Nombre moyen d'UFC pour la souche *C. albicans*

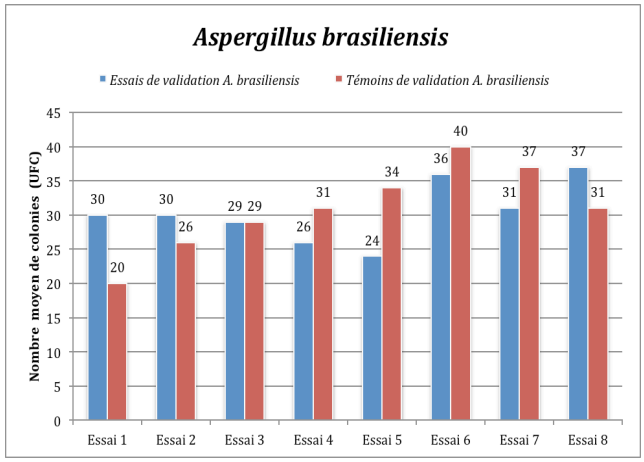


Figure 19 : Nombre moyen d'UFC pour la souche *A. brasiliensis*

D'après le nombre moyen d'UFC calculé lors de la lecture finale, le taux de recouvrement a pu être déterminé pour chaque souche et chaque essai en appliquant le calcul suivant :

$$Facteur\ de\ recouvrement = \frac{Nombre\ moyen\ d'UFC\ pour\ l'essai\ de\ validation}{Nombre\ moyen\ d'UFC\ pour\ le\ témoin\ de\ validation}$$

Il en ressort que le nombre de colonies obtenu en présence de produit (essai de validation) ne diffère pas de plus d'un facteur 2 de la valeur obtenue en l'absence de produit à tester (témoin de validation). Il n'y a donc pas d'effet inhibiteur du produit. La Figure 20 représente le facteur de recouvrement pour chaque souche lors de chaque essai.

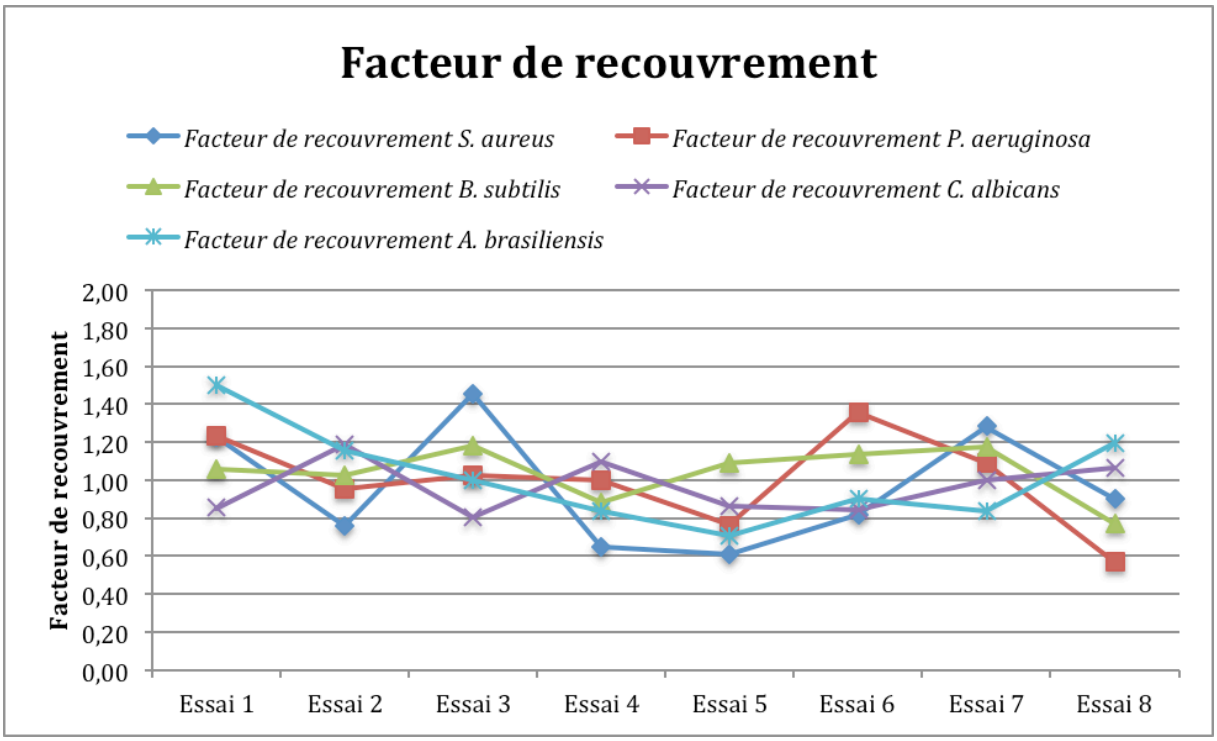


Figure 20 : Facteur de recouvrement pour chaque souche et chaque essai.

Pour chaque essai, l'aspect des colonies sur les essais de validation est identique à l'aspect des colonies sur les témoins de validation. Les illustrations suivantes sont tirées de l'essai numéro sept.

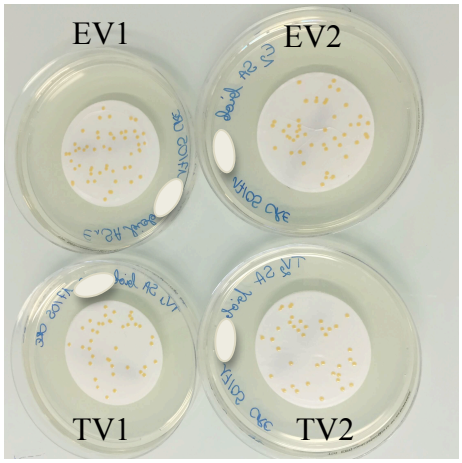


Figure 21 : Témoins et essais de validation : *S. aureus*.

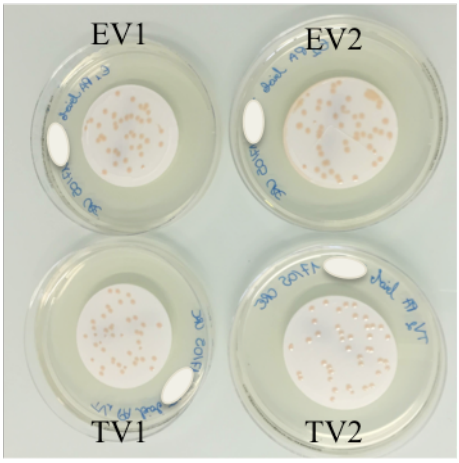


Figure 22 : Témoins et essais de validation : *P. aeruginosa*.

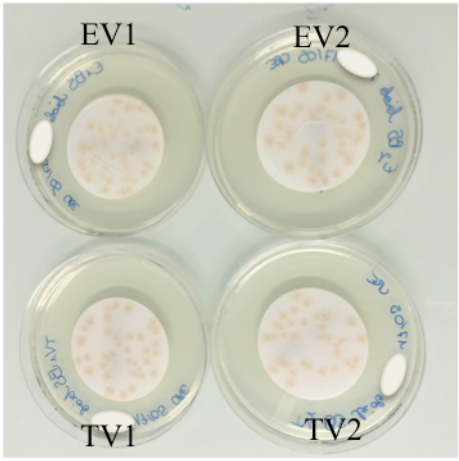


Figure 23 : Témoins et essais de validation : *B. subtilis*.

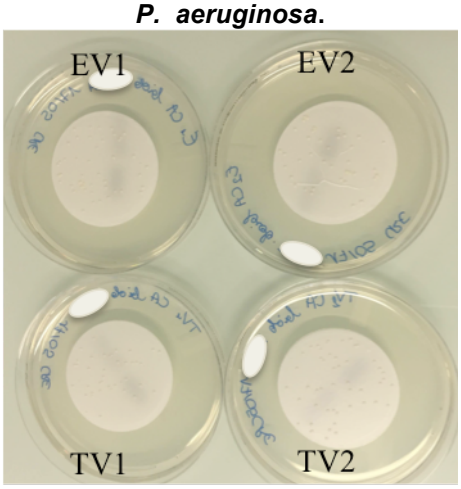


Figure 24 : Témoins et essais de validation : *C. albicans*.

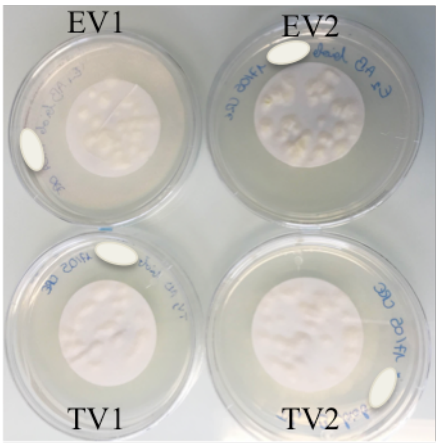


Figure 25 : Témoins et essais de validation : *A. brasiliensis*.

Le Tableau 21 présente les résultats du dénombrement microbien réalisé sur les témoins négatifs (filtration de deux fois 100 mL de DNP) et sur les témoins « produit » (filtration de 100 mL d'échantillon de produit à examiner et rinçage avec deux fois 100 mL de DNP).

Tableau 21 : Résultats du dénombrement microbien sur les témoins négatifs et les témoins "produit".

	Témoin négatif sur milieu aux peptones de caséine et soja	Témoin négatif sur milieu Sabouraud dextrosé-gélosé	Témoin produit sur milieu aux peptones de caséine et soja	Témoin produit sur milieu Sabouraud dextrosé-gélosé	Nombre moyen d'UFC/ 100 mL dans l'échantillon de produit examiné
Essai n°1	0 UFC	0 UFC	0 UFC	0 UFC	0 UFC
Essai n°2			0 UFC	0 UFC	0 UFC
Essai n°3			0 UFC	0 UFC	0 UFC
Essai n°4			16 UFC	0 UFC	8 UFC
Essai n°5			0 UFC	0 UFC	0 UFC
Essai n°6			0 UFC	0 UFC	0 UFC
Essai n°7			0 UFC	0 UFC	0 UFC
Essai n°8			0 UFC	0 UFC	0 UFC

Pour chacun des essais réalisés, aucune croissance microbienne n'est observée sur les témoins négatifs. Les essais de validation ont donc été réalisés dans des conditions permettant d'éviter toute contamination extrinsèque au produit à examiner, si une contamination est retrouvée elle ne peut pas être reliée à une erreur de manipulation.

Le nombre moyen de colonies pour 100 mL d'échantillon de produit examiné est obtenu en calculant la moyenne du nombre d'UFC sur le milieu aux peptones de caséine et de soja et sur le milieu Sabouraud dextrosé-gélosé. Concernant les essais « produit », pour les essais n° 1, 2, 3, 5, 6, 7 et 8 le nombre moyen de colonies pour les deux boîtes de milieu est de 0 UFC pour 100 mL, pour l'essai n°4 il est de 8 UFC/100 mL : les résultats sont donc conformes aux spécifications qui demandent que la biocharge avant filtration stérilisante soit inférieure à 10 UFC/ 100 mL.

L'ensemble des critères préalablement définis dans le protocole de validation a été respecté. La fiche récapitulative des anomalies correspondant à la feuille de test n°5 (voir ANNEXE 7) ne présente pas d'écart bloquant pour la validation de la méthode. La validation de la méthode de détermination de la biocharge pour les solutions de corticostéroïdes après dissolution des matières premières corticostéroïdes et avant filtration stérilisante (*bioburden*) est donc **conforme**. Un **rapport de validation** synthétisant l'ensemble des résultats obtenus a été rédigé, tout comme une **procédure** qui servira de support à la formation des techniciens et à l'utilisation en routine de la méthode. La détermination de la biocharge avant filtration stérilisante se déroulera donc de la façon suivante :

1. Placer une unité de filtration sur la rampe de filtration et remplacer son filtre par un filtre à haute résistance chimique stérile
2. Filtrer 100 mL de l'échantillon
3. Rincer avec 100 mL de DNP, deux fois
4. Prélever la membrane avec une pince stérile et la déposer sur le milieu aux peptones de caséine et soja en faisant attention à bien chasser les bulles d'air

5. Placer une nouvelle unité de filtration sur la rampe de filtration et remplacer son filtre par un filtre à haute résistance chimique stérile
6. Filtrer 100 mL de l'échantillon
7. Rincer avec 100 mL de DNP, deux fois
8. Prélever la membrane avec une pince stérile et la déposer sur le milieu Sabouraud dextrosé-gélosé en faisant attention à bien chasser les bulles d'air
9. Incuber la boîte de milieu aux peptones de caséine et soja à 30-35°C 3 à 5 jours
10. Incuber la boîte de milieu Sabouraud dextrosé-gélosé à 20-25°C 5 à 7 jours

Étant donné les observations réalisées lors de la conduite des essais de validation n°4, 6 et 8 (envahissement de la membrane par la souche testée), la lecture devra être débutée dès 24 heures d'incubation.

II.2.4. Présentation d'une méthode alternative rapide pour la détermination de la biocharge

La méthode de référence pour le dénombrement microbien par filtration sur membrane est applicable à la détermination de la biocharge avant filtration stérilisante des produits examinés, cependant, l'obtention des résultats peut demander jusqu'à une semaine. Afin de réduire ce délai et de mettre en place de potentielles mesures correctrices avant de poursuivre le procédé de fabrication, il serait intéressant d'utiliser une méthode alternative rapide. Parmi les nouvelles méthodes microbiologiques en cours de développement, la **cytométrie en phase solide**, principalement utilisée pour le contrôle des eaux de qualité pharmaceutique, représente une perspective intéressante. Cette méthode nécessite un analyseur tel que le ChemScan® couplé à un microscope à fluorescence.

Le principe de la cytométrie est la détection d'un **signal de fluorescence** émis par des microorganismes marqués. L'échantillon de produit à examiner est filtré sur une membrane permettant la rétention contaminants microbiens. Ces contaminants doivent être marqués avec un fluorophore initialement non fluorescent. Le fluorophore s'accumule dans la cellule puis est clivé par les enzymes présentes dans le cytoplasme pour générer la fluorescence. Deux paramètres sont donc indispensables à l'émission de la fluorescence : l'**intégrité de la membrane de la cellule** et l'**activité enzymatique**. La membrane est transférée dans l'analyseur puis le fluorophore est excité au laser, il émet un signal de fluorescence permettant de détecter les microorganismes fluorescents viables par balayage automatique de la totalité de la membrane (17).

Cette technique ne repose pas sur la croissance cellulaire, mais sur une **mesure directe**. Elle présente plusieurs avantages, notamment celui de permettre une **évaluation rapide des échantillons** : environ une heure et demie pour obtenir les résultats d'un bioburden donc en **temps quasi réel**. De plus, la cytométrie en phase solide permet la **détection de microorganismes viables, mais difficilement ou non cultivables** : contrairement aux méthodes de référence basées sur la croissance elle permet donc une amélioration de la qualité des contrôles par la détection d'un plus grand nombre de microorganismes (17).

En revanche, la fluorescence émise peut être due à des **particules autofluorescentes** ou à la fluorescence de la membrane par exemple. Un logiciel

est chargé de traiter les données afin de faire le tri entre les microorganismes viables et le bruit de fond, mais la possibilité de **faux positifs** subsiste (17).

Appliquée à la méthode de détermination de la biocharge avant filtration stérilisante, la technique de cytométrie en phase solide présenterait donc l'intérêt majeur de fournir des résultats rapidement, peut-être même avant d'engager la solution de corticostéroïdes dans la suite du process de fabrication du principe actif stérile. Cependant, une étude préalable doit être conduite afin de s'assurer que cette méthode pourrait s'appliquer aux solutions analysées et évaluer le bénéfice qui pourrait en être tiré par rapport aux investissements nécessaires en termes de temps et de coût.

Université de Bourgogne
UFR des Sciences de Santé
Circonscription Pharmacie

THÈSE SOUTENUE par Mme RENAUD Caroline

CONCLUSIONS

La validation d'une méthode analytique est aujourd'hui considérée comme une démarche essentielle qui apporte à l'utilisateur la confiance nécessaire dans les résultats obtenus lors de sa mise en œuvre. Cependant, la réalisation concrète de la validation des méthodes n'est pas toujours aisée. En effet, bien qu'il existe de nombreux textes réglementaires définissant les paramètres de validation, il est difficile d'obtenir des exemples pratiques de protocoles expérimentaux.

Cette difficulté est encore bien plus présente lorsqu'il s'agit de la validation des méthodes d'analyses microbiologiques. En effet, les différents guides édités par les organismes réglementaires sont plus particulièrement adaptés aux méthodes d'analyses physico-chimiques et certains critères de validation sont difficilement transposables aux méthodes microbiologiques.

Comme l'illustre le cas pratique de cette thèse, il est tout à fait possible pour les entreprises pharmaceutiques de s'appuyer sur la Pharmacopée pour la validation de méthodes de référence. Ces méthodes ne nécessitent pas la validation complète de l'ensemble de leurs paramètres mais plutôt un essai d'applicabilité décrit dans la monographie correspondante. Cependant, dans le cadre d'un système qualité performant, l'industriel ne peut pas se contenter de réaliser l'essai prescrit. Il doit dans un premier temps tenir compte des spécificités de chaque produit qui sera analysé puis l'essai doit être intégré dans une démarche globale avec la rédaction d'un protocole de validation, de fiches de test, d'un rapport de validation et la planification d'une revalidation.

Les méthodes alternatives quant à elles doivent faire l'objet d'une validation complète et le nombre réduit des référentiels, sur lesquels se baser, peut être un obstacle à leur implantation ou la ralentir. Cependant, ces méthodes sont en plein essor car elles répondent aux besoins des entreprises en terme de performances et de délai d'obtention des résultats et les monographies de la Pharmacopée européenne et de l'*US Pharmacopeia* relatives à la validation des méthodes alternatives ayant été récemment mise à jour (2015), il est possible que d'autres recommandations soient publiées afin de faciliter leur mise en œuvre.

Le Directeur de thèse,
JP LEMAITRE

Le Président,
C. ANDRES

Vu pour l'autorisation de Soutenance

Dijon, le
Le Vice-Doyen,
Y. ARTUR

BIBLIOGRAPHIE

1. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé. Bonnes pratiques de fabrication, N°2015/12 bis. 2015.

2. Food and Drug Administration. 21 CFR Part 211 - Current Good Manufacturing Practices. 2015.

3. Girault MJ. La validation: un outil essentiel dans la culture qualité. STP Pharma Prat. 1997;7(5):346-8.

4. Pandita R, Rana A, Seth N, Bala R. Introduction and General Overview of Pharmaceutical Process Validation : a Review. International Research Journal of Pharmacy [Internet]. 2012 [cité 22 mai 2016]; Disponible sur: http://www.irjponline.com/admin/php/uploads/1166_pdf.pdf

5. Pierre M. Validation des méthodes analytiques : les fondations de la conformité dans l'industrie pharmaceutique [Internet]. Mielabelo. 2015 [cité 22 mai 2016]. Disponible sur: http://www.mielabelo.be/main/index.php/fr/publications/white-papers/item/312-validation-methodes-analytiques

6. Feinberg M. Chapitre 2 - Validation et cycle de vie. In: LABO-STAT Guide de validation des méthodes d'analyse. Lavoisier; 2009. p. 33-46.

7. Bazin H. Validation de méthodes analytiques [Internet]. Hubert BAZIN conseil et formation. 2016 [cité 22 mai 2016]. Disponible sur: http://bazin-conseil.fr/validation-de-methodes.html

8. Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan A, Da Fonseca Costa Filho MA, Gomez Herrera JF, World Health Organization. Vaccine Supply and Quality Unit. Guide OMS des normes relatives aux bonnes pratiques de fabrication (BPF) [Internet]. Genève: Organisation Mondiale de la Santé; 1997 [cité 22 mai 2016]. Disponible sur: http://www.who.int/iris/handle/10665/68527

9. Food and Drug Administration. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry. 2015.

10. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology Q2(R1). 2005.

11. CTD / Work products [Internet]. ICH harmonisation for better health. [cité 22 mai 2016]. Disponible sur: http://www.ich.org/products/ctd.html

12. QUALITE DU MEDICAMENT : Comment l'assurer en restant compétitif ? [Internet]. Leem Les entreprises du médicament. 2013 [cité 22 mai 2016]. Disponible sur: http://www.leem.org/qualite-du-medicament-comment-lassurer-en-restant-competitif

13. European Medicines Agency. About us [Internet]. EUROPEAN MEDICINES AGENCY SCIENCE MEDICINES HEALTH. 2016 [cité 22 mai 2016]. Disponible sur:

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/document_listing/document_listing_000426.jsp&mid=

14. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. 2011.

15. Qu'est-ce que la Pharmacopée ? [Internet]. ANSM Agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé. 2016 [cité 22 mai 2016]. Disponible sur: http://ansm.sante.fr/Activites/Pharmacopee/Qu-est-ce-que-la-Pharmacopee/(offset)/0

16. EDQM. 1. Prescriptions générales. In: Pharmacopée européenne. 8e éd. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2014. p. 4155-63.

17. EDQM. 5.1.6. Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique. In: Pharmacopée européenne. 8e éd. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2014. p. 603-14.

18. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Draft Guidance. 2013.

19. The United States Pharmacopeial Convention. Legal Recognition of USP Standards [Internet]. U.S. Pharmacopeial Convention. 2016 [cité 22 mai 2016]. Disponible sur: http://www.usp.org/about-usp/legal-recognition

20. United States Pharmacopeial Convention. <1225> Validation of compendial procedures. In: USP 39 NF 34. 39e éd. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention; 2016. p. 1640-5.

21. United States Pharmacopeial Convention. <1226> Verification of compendial procedures. In: USP 39 NF 34. 39e éd. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention; 2016. p. 1646-7.

22. United States Pharmacopeial Convention. <1223> Validation of alternative microbiological methods. In: USP 39 NF 34. 39e éd. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention; 2016. p. 1616-30.

23. History [Internet]. ICH harmonisation for better health. [cité 22 mai 2016]. Disponible sur: http://www.ich.org/about/history.html

24. Organisation of ICH [Internet]. ICH harmonisation for better health. [cité 22 mai 2016]. Disponible sur: http://www.ich.org/about/organisation-of-ich.html

25. ICH Guidelines / Work products [Internet]. ICH harmonisation for better health. [cité 22 mai 2016]. Disponible sur: http://www.ich.org/products/guidelines.html

26. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Good Manufacturing Practices Guide for Active Pharmaceutical Ingredients Q7. 2000.

27. International Organization for Standardization (ISO). ISO 17025:2005 Exigences générales concernant les compétences des laboratoires d'étalonnage et d'essai. 2010.

28. Huber L. Validation of Analytical Methods [Internet]. Agilent Technology; 2010 [cité 22 mai 2016]. Disponible sur: https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-5140EN.pdf

29. Désenfant M, Priel M, Rivier C. De la validation des méthodes d'analyse à l'évaluation de l'incertitude des résultats de mesure. Actes Congrès Int Métrologie Toulon. 2003;

30. International Organization for Standardization (ISO). ISO 5725-1:1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Partie 1: Principes généraux et définitions. 2012.

31. Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme. Validation Master Plan, Installation and Operational Qualification, Non-sterile Process Validation, Cleaning Validation. 2007.

32. Fabre H, Blanchin M-D, Perrin C. Qualification de l'appareillage analytique. Tech Ing Anal Caractér. 12 oct 2008;SL290.

33. United States Pharmacopeial Convention. <1058> Analytical instrument qualification. In: USP 39 NF 34. 39e éd. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention; 2016. p. 1055-61.

34. United States Pharmacopeial Convention. <1115> Bioburden control of non Sterile drug substances and products. In: USP 39 NF 34. 39e éd. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention; 2016. p. 1329-36.

35. Shintani H. Validation Study of Rapid Assays of Bioburden, Endotoxins and Other Contamination. Biocontrol Sci. 2016;21(2):63-72.

36. Sandle T. Approaching Microbiological Method Validation| IVT [Internet]. IVT NETWORK. 2015 [cité 22 mai 2016]. Disponible sur: http://www.ivtnetwork.com/article/approaching-microbiological-method-validation

37. Sandle T. Approaching the Selection of Rapid Microbiological Methods. J Valid Technol. 2014;20(2):1-10.

38. Duguid J, Balkovic E, du Moulin GC. RMM-Rapid Microbiological Methods: Where are they now? Am Pharm Rev. 11 janv 2011;14(7):18.

39. Miller MJ. A Fresh Look at USP <1223> Validation of Alternative Microbiological Methods and How the Revised Chapter Compares with PDA TR33 and the Proposed Revision to Ph. Eur. 5.1.6. Am Pharm Rev [Internet]. 31 juill 2015; Disponible sur: http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/177873-A-Fresh-Look-at-USP-1223-Validation-of-Alternative-Microbiological-Methods-and-How-the-Revised-Chapter-Compares-with-PDA-TR33-and-the-Proposed-Revision-to-Ph-Eur-5-1-6/

40. Sutton S. Validation of alternative microbiology methods for product testing. Pharm Technol. 2005;118-22.

41. EDQM. 2.6.12. Contrôle microbiologiques des produits non stériles : essais de dénombrement microbien. In: Pharmacopée européenne. 8e éd. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2014. p. 198-202.

42. United States Pharmacopeial Convention. <61> Microbiological examination of non sterile products : microbial enumeration tests. In: USP 39 NF 34. 39e éd. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention; 2016. p. 117-23.

43. EDQM. 5.1.4. Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles. In: Pharmacopée européenne. 8e éd. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2014. p. 601-2.

44. EDQM. 2.6.13. Contrôle microbiologique des produits non stériles : recherche de microorganismes spécifiés. In: Pharmacopée européenne. 8e éd. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2014. p. 202-7.

45. United States Pharmacopeial Convention. <62> Microbiological examination of nonsterile products : tests for specified microorganisms. In: USP 39 NF 34. 39e éd. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention; 2016. p. 123-30.

46. Vu N, Lou JR, Kupiec TC. Quality Control: Microbial Limit Test for Nonsterile Pharmaceuticals, Part 2. Int J Pharm Compd. août 2014;18(4):305-10.

47. EDQM. 2.6.1 Stérilité. In: Pharmacopée européenne. 8e éd. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2014. p. 187-90.

48. United States Pharmacopeial Convention. <71> Sterility tests. In: USP 39 NF 34. 39e éd. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention; 2016. p. 136-43.

49. Verjat-Trannoy D, Vadrot C, Danan C, Rachon A. Analyses en microbiologie: Produits stériles. Tech Ing Anal Caractér. 2006;SL1(P3354).

50. EDQM. 2.6.14. Essai des endotoxines bactériennes. In: Pharmacopée européenne. 8e éd. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2014. p. 207-11.

51. Greff-Mirguet G. Echantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air. Etude bibliographique. Hygiène Sécurité Trav. 2002;(187):73-87.

52. United States Pharmacopeial Convention. <85> Bacterial endotoxins test. In: USP 39 NF 34. 39e éd. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention; 2016. p. 161-7.

53. EDQM. 5.1.10. Recommandations pour la réalisation de l'essai des endotoxines bactériennes. In: Pharmacopée européenne. 8e éd. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2014. p. 6325-8.

54. United States Pharmacopeial Convention. <1227> Validation of microbial recovery from pharmacopeial articles. In: USP 39 NF 34. 39e éd. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention; 2016. p. 1647-51.

55. Vu N, Lou JR, Kupiec TC. Quality Control Analytical Methods : Microbial Limit Tests for Nonsterile Pharmaceuticals Part 1. Int J Pharm Compd. juin 2014;18(3):213-21.

56. EDQM. 5.1.1. Méthode de préparation des produits stériles. In: Pharmacopée européenne. 8e éd. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2014. p. 597-9.

57. Limayem Blouza I. La stérilisation [Internet]. 2013. Disponible sur: http://pharmask.tn/PharmaskSynchro/3eme-annee-pharmacie/premier-semestre/pharmacie-galenique/cours-sterilisation-galenique.pdf

58. United States Pharmacopeial Convention. <1229.3> Monitoring of bioburden. In: USP 39 NF 34. 39e éd. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention; 2016. p. 1664-7.

59. Norme NFT. 72 101: Antiseptiques et désinfectants–vocabulaire. AFNOR. Indice de classement T72-101. Mars. 1981;

60. Ortolland C, Tayeg F. Les équipements du contrôle qualité en stérilisation [Internet]. Université de Technologie de Compiègne; 2002. Disponible sur: http://www.utc.fr/~farges/dess_tbh/02-03/UVs/sterilisation/Explorer/accueil.htm#accueil

61. Belgaid A, Benaji B, Aadil N, Moussamih S, Khayati Y, Taoudi Benchekroune M, et al. Sterilisation of aseptic drug by sterile filtration : microbiology validation by microbiology challenge test. J Chem Pharm Res. 2014;6(12):760-70.

62. EDQM. 5.1.2 Indicateurs biologiques de stérilisation. In: Pharmacopée européenne. 8e éd. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2014. p. 599-600.

63. Norimah Y. 13 Bioburden estimation in relation to sterilisation. In: Advances in Tissue Banking. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.; 2001.

64. European Medicines Agency. Note for guidance on manufacture of the finished product CHMP/QWP/486/95 1996. 1996.

65. European Medicines Agency. Draft guideline on the sterilisation of medicinal product, active substance, excipient and primary container. 2016.

66. European Medicines Agency. The use of ionising radiation in the manufacture of medicinal products. 1991.

67. Food and Drug Administration. Sterile drug product produced by aseptic processing. 2004.

68. Guyomard S. Suivi de la biocharge (bioburden) des solutions stériles avant stérilisation en 2010. La vague. sept 2010;(30):16-8.

69. Balty I, Belhanini B, Clermont H, Cornu J, Jacquet M, Texte J. Postes de sécurité microbiologique Postes de sécurité cytotoxique. Hygiène Sécurité Trav. 2003;(193):37-52.

70. International Organization for Standardization (ISO). ISO 14698-1 : 2003 Salles propres et environnements maîtrisés apparentés - Maîtrise de la biocontamination - Partie 1 : Princes généraux et méthodes. 2003.

71. International Organization for Standardization (ISO). ISO 14644-1 :1999 Salles propres et environnements maîtrisés apparentés - Partie 1 : Classification de la propreté particulaire de l'air. 2015.

72. AFNOR. FD X15-140 Mesure de l'humidité de l'air-Enceintes climatiques et thermostatiques-Caractérisation et vérification. 2013.

ANNEXE 1

Milieu ou diluant	Composition théorique		
Gélose TSA	Peptone de caséine (bovin) Peptone de soja Chlorure de sodium Agar Eau purifiée	15g 5 g 5 g 15 g 1 L	pH 7,3
Gélose Sabouraud	Peptone de caséine (bovin) Peptone de viande (bovin ou porcin) Glucose Agar Eau purifiée	5 g 5 g 40 g 15 g 1 L	pH 5,6
DNP	Peptone de caséine ou de viande (bovin ou porcin) Polysorbate 80 Lécithine de jaune d'œuf Chlorhydrate d'histidine Chlorure de sodium Phosphate monopotassique Phosphate disodique hydraté Eau purifiée	1 g 30 g 3 g 1 g 4,3 g 3,6 g 7,2 g 1 L	pH 7

Source : fiches techniques des milieux et diluants, laboratoires Biomérieux®.

ANNEXE 2

FAREVA ROMAINVILLE	**Fiche de test n°01** Conformité des produits utilisés pour l'étude de validation	**Validation de la méthode de bioburden** **FRMV-V-00118**

	Corticostéroïde MP	Solvant 1	Solvant 2
Nom			
Numéro de lot			

1. Objectif(s)

L'objectif de ce test est de vérifier la conformité des produits utilisés pour l'étude de validation. Les produits comprennent : les milieux de culture et diluants, les micro-organismes de référence et leur liquide de réhydratation des bioballs ainsi que les solvants.

2. Méthode

Vérifier le numéro de contrôle et la date de péremption des produits utilisés.

3. Critères d'acceptation

Chaque produit possède un numéro de contrôle qui atteste du contrôle réalisé à réception.
Les produits sont utilisés avant leur date de péremption.

4. Résultats

PRODUITS UTILISÉS			
	N° de contrôle	**Date de péremption**	**C/NC**
Milieux de culture et diluants			
Milieu gélosé TSA			
Milieu Sabouraud gélosé-dextrosé			
DNP			
Microorganismes de référence			
Staphylococcus aureus NCTC 10788			
Pseudomonas aeruginosa NCTC 12924			
Bacillus subtilis NCTC 10400			
Candida albicans NCPF 3179			
Aspergillus brasiliensis NCPF 2275			
Liquide de réhydratation			
Solvants			
Nom du solvant 1			
Nom du solvant 2			

Commentaires :

……
……
……
……
……
……
……
……

Conclusion :

Tous les produits utilisés ont été validés à réception	OUI*	NON*
Tous les produits sont utilisés avant leur date de péremption	OUI*	NON*
Le résultat du test de vérification des produits utilisés est :	**Conforme***	**Non conforme***

*Rayer la mention inutile

Nombre d'écarts observés		Numéro(s) de fiche(s) d'anomalie	

	Réalisation	**Vérification**	**Approbation**
Date			
Visa			

ANNEXE 3

FAREVA ROMAINVILLE	**Fiche de test n°02** Conformité du matériel utilisé pour l'étude de validation	**Validation de la méthode de bioburden** **FRMV-V-00118**

	Corticostéroïde MP	Solvant 1	Solvant 2
Nom			
Numéro de lot			

1. Objectif(s)

L'objectif de ce test est de vérifier la conformité du matériel utilisé pour l'étude de validation. Le matériel comprend : la balance, les étuves (30-35°C et 20-25°C), la micropipette, le PSM et le thermomètre de contrôle de la température.

2. Méthode

Vérifier les dates de la dernière et de la prochaine qualification de l'équipement.

3. Critères d'acceptation

L'ensemble du matériel est qualifié ou calibré. La qualification est valide au moment de la réalisation de l'étude de validation.

4. Résultats

MATÉRIEL UTILISÉ			
Numéro	**Date de la dernière qualification**	**Date de la prochaine qualification**	**C/NC**
BALANCE			
ÉTUVE 20-25°C			
ETUVE 30-35°C			
MICROPIPETTE			
PSM			
THERMOMETRE			

C/NC : Conforme/Non conforme

Commentaires :

……
……
……
……

Conclusion :

L'ensemble du matériel est qualifié/calibré	OUI*	NON*
La qualification/calibration est valide au moment du test	OUI*	NON*
Le résultat du test de vérification du matériel utilisé est :	**Conforme***	**Non conforme***

*Rayer la mention inutile

Nombre d'écarts observés		Numéro(s) de fiche(s) d'anomalie	

	Réalisation	**Vérification**	**Approbation**
Date			
Visa			

ANNEXE 4

FAREVA ROMAINVILLE	**Fiche de test n°03** Essais pour la validation de la méthode de détermination de la biocharge	**Validation de la méthode de bioburden** **FRMV-V-00118**

	Corticostéroïde MP	Solvant 1	Solvant 2
Nom			
Numéro de lot			

1. Objectif(s)

L'objectif de ce test est de s'assurer que la validation de la méthode de détermination de la biocharge est réalisée conformément au protocole préétabli.

2. Méthode

Suivre la réalisation de chaque étape/manipulation décrite dans le protocole et noter les paramètres à respecter pour être en conformité avec le protocole préétabli.

Les étapes sont :

- Préparation de l'échantillon
- Préparation des micro-organismes de référence
- Réalisation des essais de validation
- Réalisation des témoins de validation
- Réalisation des témoins négatifs
- Réalisation des essais produits

3. Critères d'acceptation

Chaque étape est réalisée conformément au protocole préétabli et les différents paramètres sont respectés.

4. Résultats

1) Préparation de l'échantillon

	Corticostéroïde	Solvant 1	Solvant 2
Nom			
Numéro de lot			
Péremption			
Proportion			
Quantité prélevée	**g**		
Volume calculé		**mL**	**mL**
Volume mesuré		**mL**	**mL**
Conforme/ Non conforme			

Volume total de l'échantillon	**mL**

Température attendue du bain-marie	**°C**
Température mesurée	**°C**
Conforme/ Non conforme	

Durée de l'agitation	**min**	**Produit dissous**	**OUI/NON***

*Rayer la mention inutile

pH mesuré	

2) Préparation des micro-organismes de référence

Micro-organismes de référence	Date de reconstitution	Concentration théorique (UFC/mL)	Utilisation dans les 2h suivant la reconstitution ou dans les 24h si conservation entre 2 et 8°C	Conforme/Non conforme
Staphylococcus aureus NCTC 10788			OUI/NON*	
Pseudomonas aeruginosa NCTC 12924			OUI/NON*	
Bacillus subtilis NCTC 10400			OUI/NON*	
Candida albicans NCPF 3179			OUI/NON*	
Aspergillus brasiliensis NCPF 2275			OUI/NON*	

*Rayer la mention inutile

3) Réalisation des essais de validation : filtration du produit en présence des souches

- ***Staphylococcus aureus***

ÉTAPES			E1	E2
1	**Volume échantillon filtré**	10 mL	☐	☐
2	**Rinçage 1**	10 mL de DNP + 100 µL de suspension de souches	☐	☐
3	**Rinçage 2**	10 mL de DNP	☐	☐
4	**Gélose utilisée**	TSA	☐	☐
5	**Température d'incubation**	30-35°C	☐	☐
6	**Durée d'incubation**	≤ 3 jours	☐	☐

E1 : Essai de validation 1/**E2** : Essai de validation 2

Numéro de l'étuve		Date d'incubation	

- ***Pseudomonas aeruginosa***

ÉTAPES			E1	E2
1	**Volume échantillon filtré**	10 mL	☐	☐
2	**Rinçage 1**	10 mL de DNP + 100 µL de suspension de souches	☐	☐
3	**Rinçage 2**	10 mL de DNP	☐	☐
4	**Gélose utilisée**	TSA	☐	☐
5	**Température d'incubation**	30-35°C	☐	☐
6	**Durée d'incubation**	≤ 3 jours	☐	☐

E1 : Essai de validation 1/**E2** : Essai de validation 2

Numéro de l'étuve		**Date d'incubation**	

- ***Bacillus subtilis***

ÉTAPES			E1	E2
1	**Volume échantillon filtré**	10 mL	☐	☐
2	**Rinçage 1**	10 mL de DNP + 100 µL de suspension de souches	☐	☐
3	**Rinçage 2**	10 mL de DNP	☐	☐
4	**Gélose utilisée**	TSA	☐	☐
5	**Température d'incubation**	30-35°C	☐	☐
6	**Durée d'incubation**	≤ 3 jours	☐	☐

E1 : Essai de validation 1/**E2** : Essai de validation 2

Numéro de l'étuve		**Date d'incubation**	

- ***Candida albicans***

ÉTAPES			E1	E2
1	**Volume échantillon filtré**	10 mL	☐	☐
2	**Rinçage 1**	10 mL de DNP + 100 µL de suspension de souches	☐	☐
3	**Rinçage 2**	10 mL de DNP	☐	☐
4	**Gélose utilisée**	Sabouraud	☐	☐
5	**Température d'incubation**	20-25°C	☐	☐
6	**Durée d'incubation**	≤ 5 jours	☐	☐

E1 : Essai de validation 1/**E2** : Essai de validation 2

Numéro de l'étuve		**Date d'incubation**	

- ***Aspergillus brasiliensis***

ÉTAPES			E1	E2
1	**Volume échantillon filtré**	10 mL	☐	☐
2	**Rinçage 1**	10 mL de DNP + 100 µL de suspension de souches	☐	☐
3	**Rinçage 2**	10 mL de DNP	☐	☐
4	**Gélose utilisée**	Sabouraud	☐	☐
5	**Température d'incubation**	20-25°C	☐	☐
6	**Durée d'incubation**	≤ 5 jours	☐	☐

E1 : Essai de validation 1/**E2** : Essai de validation 2

Numéro de l'étuve		**Date d'incubation**	

4) Réalisation des témoins validation : filtration du diluant (absence de produit) en présence des souches

- ***Staphylococcus aureus***

ÉTAPES			TV1	TV2
1	**Volume échantillon filtré**	0 mL	☐	☐
2	**Volume diluant filtré**	10 mL	☐	☐
3	**Rinçage 1**	10 mL de DNP + 100 µL de suspension de souches	☐	☐
4	**Rinçage 2**	10 mL de DNP	☐	☐
5	**Gélose utilisée**	TSA	☐	☐
6	**Température d'incubation**	30-35°C	☐	☐
7	**Durée d'incubation**	≤ 3 jours	☐	☐

TV1 : Témoin de validation 1/**TV2** : Témoin de validation 2

Numéro de l'étuve		**Date d'incubation**	

- ***Pseudomonas aeruginosa***

ÉTAPES			TV1	TV2
1	**Volume échantillon filtré**	0 mL	☐	☐
2	**Volume diluant filtré**	10 mL	☐	☐
3	**Rinçage 1**	10 mL de DNP + 100 µL de suspension de souches	☐	☐
4	**Rinçage 2**	10 mL de DNP	☐	☐
5	**Gélose utilisée**	TSA	☐	☐
6	**Température d'incubation**	30-35°C	☐	☐
7	**Durée d'incubation**	≤ 3 jours	☐	☐

TV1 : Témoin de validation 1/**TV2** : Témoin de validation 2

Numéro de l'étuve		**Date d'incubation**	

- ***Bacillus subtilis***

ÉTAPES			TV1	TV2
1	**Volume échantillon filtré**	0 mL	☐	☐
2	**Volume diluant filtré**	10 mL	☐	☐
3	**Rinçage 1**	10 mL de DNP + 100 µL de suspension de souches	☐	☐
4	**Rinçage 2**	10 mL de DNP	☐	☐
5	**Gélose utilisée**	TSA	☐	☐
6	**Température d'incubation**	30-35°C	☐	☐
7	**Durée d'incubation**	≤ 3 jours	☐	☐

TV1 : Témoin de validation 1/**TV2** : Témoin de validation 2

Numéro de l'étuve		**Date d'incubation**	

- ***Candida albicans***

ÉTAPES			TV1	TV2
1	**Volume échantillon filtré**	0 mL	☐	☐
2	**Volume diluant filtré**	10 mL	☐	☐
3	**Rinçage 1**	10 mL de DNP + 100 µL de suspension de souches	☐	☐
4	**Rinçage 2**	10 mL de DNP	☐	☐
5	**Gélose utilisée**	Sabouraud	☐	☐
6	**Température d'incubation**	20-25°C	☐	☐
7	**Durée d'incubation**	≤ 5 jours	☐	☐

TV1 : Témoin de validation 1/**TV2** : Témoin de validation 2

Numéro de l'étuve		**Date d'incubation**	

- ***Aspergillus brasiliensis***

ÉTAPES			TV1	TV2
1	**Volume échantillon filtré**	0 mL	☐	☐
2	**Volume diluant filtré**	10 mL	☐	☐
3	**Rinçage 1**	10 mL de DNP + 100 µL de suspension de souches	☐	☐
4	**Rinçage 2**	10 mL de DNP	☐	☐
5	**Gélose utilisée**	Sabouraud	☐	☐
6	**Température d'incubation**	20-25°C	☐	☐
7	**Durée d'incubation**	≤ 5 jours	☐	☐

TV1 : Témoin de validation 1/**TV2** : Témoin de validation 2

Numéro de l'étuve		**Date d'incubation**	

5) Réalisation des témoins négatifs : filtration du diluant (absence de produit) et rinçage avec le diluant (absence de souches)

ÉTAPES				T(-)1	T(-)2
1	**Volume échantillon filtré**	0 mL		☐	☐
2	**Volume diluant filtré**	0 mL		☐	☐
3	**Rinçage 1**	100 mL de DNP		☐	☐
4	**Rinçage 2**	100 mL de DNP		☐	☐
5	**Gélose utilisée**	**T(-)1**	**T(-)2**	☐	☐
		TSA	Sabouraud		
6	**Température d'incubation**	**T(-)1**	**T(-)2**	☐	☐
		30-35°C	20-25°C		
7	**Durée d'incubation**	**T(-)1**	**T(-)2**	☐	☐
		3 à 5 jours	5 à 7 jours		

T(-) 1 : Témoin négatif 1/**T(-)2** : Témoin négatif 2

Numéro de l'étuve	T(-)1 T(-)2	**Date d'incubation**	

6) Réalisation des essais « produit »

ÉTAPES				TP1	TP2
1	**Volume échantillon filtré**	100 mL		☐	☐
2	**Rinçage 1**	100 mL de DNP		☐	☐
3	**Rinçage 2**	100 mL de DNP		☐	☐
4	**Gélose utilisée**	**EP1**	**EP2**	☐	☐
		TSA	Sabouraud		
5	**Température d'incubation**	**EP1**	**EP2**	☐	☐
		30-35°C	20-25°C		
6	**Durée d'incubation**	**EP1**	**EP2**	☐	☐
		3 à 5 jours	5 à 7 jours		

EP1 : Essai produit 1/**EP2** : Essai produit 2

Numéro de l'étuve	TP1	**Date d'incubation**	
	TP2		

Commentaires :

……
……
……
……
……
……
……

Conclusion :

L'échantillon a été réalisé conformément aux paramètres définis dans le protocole	OUI*	NON*
Les essais de validation ont été réalisés conformément aux paramètres définis dans le protocole	OUI*	NON*
Les témoins de validation ont été réalisés conformément aux paramètres définis dans le protocole	OUI*	NON*
Les témoins négatifs ont été réalisés conformément aux paramètres définis dans le protocole	OUI*	NON*
Les essais produits ont été réalisés conformément aux paramètres définis dans le protocole	OUI*	NON*
La méthodologie décrite dans le protocole pour la validation de la méthode de détermination de la biocharge a été respectée	**Conforme***	**Non conforme***

*Rayer la mention inutile

Nombre d'écarts observés		Numéro(s) de fiche(s) d'anomalie	

	Réalisation	**Vérification**	**Approbation**
Date			
Visa			

ANNEXE 5

FAREVA ROMAINVILLE	**Fiche de test n°04** Applicabilité de la méthode : résultats et interprétation	**Validation de la méthode de bioburden** **FRMV-V-00118**

	Corticostéroïde MP	Solvant 1	Solvant 2
Nom			
Numéro de lot			

1. Objectif(s)

L'objectif de ce test est de vérifier si la méthode de détermination de la biocharge est validée et pourra être utilisée en routine.

2. Méthode

Transcription des résultats de l'étude de validation réalisée (feuille de test n°3), calcul du facteur de recouvrement et vérification des critères d'acceptation.

3. Critères d'acceptation

Définis dans le protocole au chapitre 7) Critères d'acceptation.

4. Résultats

- ***Staphylococcus aureus***

	Jour 1		**Jour 2**		**Jour 3**		**Jour 4**		**Jour 5**	
S. aureus (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**

E1 : Essai de validation 1/**E2** : Essai de validation 2 /**TV1** : Témoin de validation 1/**TV2** : Témoin de validation 2

- ***Pseudomonas aeruginosa***

	Jour 1		**Jour 2**		**Jour 3**		**Jour 4**		**Jour 5**	
P. aeruginosa (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**

E1 : Essai de validation 1/**E2** : Essai de validation 2 /**TV1** : Témoin de validation 1/**TV2** : Témoin de validation 2

- ***Bacillus subtilis***

	Jour 1		**Jour 2**		**Jour 3**		**Jour 4**		**Jour 5**	
B. subtilis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**

E1 : Essai de validation 1/**E2** : Essai de validation 2 /**TV1** : Témoin de validation 1/**TV2** : Témoin de validation 2

- ***Candida albicans***

	Jour 1		**Jour 2**		**Jour 3**		**Jour 4**		**Jour 5**	
C. albicans (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**

E1 : Essai de validation 1/**E2** : Essai de validation 2 /**TV1** : Témoin de validation 1/**TV2** : Témoin de validation 2

- ***Aspergillus brasiliensis***

	Jour 1		Jour 2		Jour 3		Jour 4		Jour 5	
A. brasiliensis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**

E1 : Essai de validation 1/**E2** : Essai de validation 2 /**TV1** : Témoin de validation 1/**TV2** : Témoin de validation 2

- **Lecture finale**

	Staphylococcus aureus		*Pseudomonas aeruginosa*		*Bacillus subtilis*		*Candida albicans*		*Aspergillus brasiliensis*	
	E1	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	M =		M=		M=		M=		M=	
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	M=		M=		M=		M=		M=	
Facteur de recouvrement E/TV										
Le facteur de recouvrement ne doit pas différer de plus d'un facteur 2 entre l'essai et le témoin de validation	**Conforme/ Non conforme***		**Conforme/ Non conforme***		**Conforme/ Non conforme***		**Conforme/ Non conforme***		**Conforme/ Non conforme***	

E1 : Essai de validation 1/**E2** : Essai de validation 2 /**TV1** : Témoin de validation 1/**TV2** : Témoin de validation 2/ **M** : Moyenne

- **Témoins négatifs**

	Gélose TSA	**Gélose Sabouraud**
Nombre de colonies en UFC		
Aucune croissance bactérienne ne doit être observée sur les témoins négatifs	**Conforme/Non conforme***	**Conforme/Non conforme***

- **Essais produit**

	Gélose TSA	**Gélose Sabouraud**
Nombre de colonies en UFC		
Nombre de colonies inférieur à 10 UFC pour 100 ml sur l'essai produit	**Conforme/Non conforme ***	**Conforme/Non conforme ***

Commentaires :

……
……
……
……
……
……
……
……
……

Conclusion : Check-list des critères d'acceptation pour la validation de la méthode de détermination de la biocharge

Nombre de colonies des souches de référence pour les témoins de validation compris entre 10 et 100 UFC	OUI*	NON*
Nombre de colonies obtenu en présence de produit (essai de validation) ne doit pas différer de plus d'un facteur 2 de la valeur obtenue en l'absence de produit à tester (témoin de validation) i.e. pourcentage de recouvrement entre 50 et 200 %	OUI*	NON*
Aspect des colonies sur essais de validation identique aux témoins de validation	OUI*	NON*
Aucune croissance microbienne observée sur le témoin négatif	OUI*	NON*
Nombre de colonies inférieur à 10 UFC pour 100 ml sur l'essai produit	OUI*	NON*
La validation de la méthode de détermination de la biocharge est :	**Conforme***	**Non conforme***

*Rayer la mention inutile

Nombre d'écarts observés		Numéro(s) de fiche(s) d'anomalie	

	Réalisation	**Vérification**	**Approbation**
Date			
Visa			

ANNEXE 6

Essai n°1

	Jour 1		Jour 2		Jour 3		Jour 4		Jour 5	
S. aureus (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	29	43	30	45	/	/				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	29	32	29	32	/	/				
P. aeruginosa (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	57	47	57	48	/	/				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	45	34	46	35	/	/				
B. subtilis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	54	54	54	54	/	/				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	51	50	51	51	/	/				
C. albicans (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	0	0	51	24	/	/	/	/	54	27
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	0	0	45	50	/	/	/	/	45	50
A. brasiliensis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	0	0	0	0	/	/	/	/	27	32
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	0	0	0	0	/	/	/	/	21	18

Essai n°2

	Jour 1		Jour 2		Jour 3		Jour 4		Jour 5	
S. aureus (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	31	36	33	36	33	36				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	45	47	45	47	NA	NA				
P. aeruginosa (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	45	34	45	34	NA	NA				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	42	42	42	42	NA	NA				
B. subtilis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	46	40	46	40	NA	NA				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	39	45	39	45	NA	NA				
C. albicans (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	0	0	52	43	55	44	/	/	/	/
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	0	0	41	42	42	42	/	/	/	/
A. brasiliensis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	0	0	0	0	35	24	/	/	/	/
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	0	0	0	0	22	29	/	/	/	/

Essai n°3

	Jour 1		Jour 2		Jour 3		Jour 4		Jour 5	
S. aureus (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	44	52	/	/	/	/				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	30	56	/	/	/	/				
P. aeruginosa (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	47	40	/	/	/	/				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	50	35	/	/	/	/				
B. subtilis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	53	51	/	/	/	/				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	43	44	/	/	/	/				
C. albicans (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	0	0	/	/	/	/	36	39	36	39
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	0	0	/	/	/	/	46	36	46	36
A. brasiliensis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	0	0	/	/	/	/	29	29	29	29
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	0	0	/	/	/	/	31	26	31	26

Essai n°4

	Jour 1		Jour 2		Jour 3		Jour 4		Jour 5	
S. aureus (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	31	27	33	28	33	28				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	37	58	37	58	NA	NA				
P. aeruginosa (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	31	NI	36	NI	37	NI				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	30	43	30	44	30	44				
B. subtilis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	34	39	34	39	NA	NA				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	41	42	41	42	NA	NA				
C. albicans (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	0	0	30	33	32	35	/	/	/	/
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	0	0	27	35	27	35	/	/	/	/
A. brasiliensis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	0	0	25	22	25	26	/	/	/	/
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	0	0	26	30	29	33	/	/	/	/

Essai n°5

	Jour 1		Jour 2		Jour 3		Jour 4		Jour 5	
S. aureus (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	34	28	34	28	NA	NA				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	61	41	61	41	NA	NA				
P. aeruginosa (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	43	19	43	21	43	21				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	46	37	46	37	NA	NA				
B. subtilis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	50	47	50	47	NA	NA				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	43	44	44	45	44	45				
C. albicans (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	0	0	45	41	46	42	/	/	/	/
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	0	0	45	54	47	55	/	/	/	/
A. brasiliensis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	0	0	20	25	22	26	/	/	/	/
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	0	0	30	31	35	33	/	/	/	/

Essai n°6

	Jour 1		Jour 2		Jour 3		Jour 4		Jour 5	
S. aureus (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	/	/	/	/	39	40				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	/	/	/	/	45	52				
P. aeruginosa (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	/	/	/	/	38	46				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	/	/	/	/	18	43				
B. subtilis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	/	/	/	/	NI	51				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	/	/	/	/	51	39				
C. albicans (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	/	/	/	/	48	27	48	28	48	28
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	/	/	/	/	46	43	46	43	NA	NA
A. brasiliensis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	/	/	/	/	35	36	35	36	NA	NA
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	/	/	/	/	43	36	43	36	NA	NA

Essai n°7

	Jour 1		Jour 2		Jour 3		Jour 4		Jour 5	
S. aureus (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	51	48	51	48	NA	NA				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	39	38	40	38	40	38				
P. aeruginosa (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	43	52	43	52	NA	NA				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	43	44	43	44	NA	NA				
B. subtilis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	52	42	52	42	NA	NA				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	43	37	43	37	NA	NA				
C. albicans (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	0	0	50	40	50	40	/	/	/	/
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	0	0	40	49	40	49	/	/	/	/
A. brasiliensis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	0	0	0	0	29	32	/	/	/	/
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	0	0	0	0	41	32	/	/	/	/

Essai n°8

	Jour 1		Jour 2		Jour 3		Jour 4		Jour 5	
S. aureus (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	48	42	48	43	NA	43				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	46	55	46	55	NA	NA				
P. aeruginosa (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	21	37	NI	NI	NI	NI				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	49	53	49	53	NA	NA				
B. subtilis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	26	34	NI	NI	NI	NI				
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	33	44	33	44	NI	NI				
C. albicans (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	0	0	39	51	44	53	/	/	/	/
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	0	0	47	42	48	43	/	/	/	/
A. brasiliensis (UFC)	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
	0	0	0	0	37	37	/	/	/	/
	TV1	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**	**TV1**	**TV2**
	0	0	0	0	31	30	/	/	/	/

ANNEXE 7

FAREVA ROMAINVILLE	**Fiche de test n°05** Fiche récapitulative des anomalies	**Validation de la méthode de bioburden** **FRMV-V-00118**

	Corticostéroïde MP	Solvant 1	Solvant 2
Nom			
Numéro de lot			

N° fiche d'anomalie	Feuille de test	Description de l'anomalie	Statut*	Date	Visa

*Bloquant /non bloquant pour la validation

Commentaires :

……
……
……
……
……
……
……
……
……

Conclusion :

Présence*/Absence* d'écarts bloquants pour la validation de la méthode de détermination de la biocharge.

*Rayer la mention inutile

	Réalisation	Vérification	Approbation
Date			
Visa			

Université de Bourgogne
UFR des Sciences de Santé
Circonscription Pharmacie

TITRE DE LA THÈSE : Validation des méthodes analytiques : application à une méthode de détermination de la biocharge (*bioburden*) avant filtration stérilisante issue de la Pharmacopée européenne

AUTEUR : Caroline RENAUD

RÉSUMÉ :

La validation des méthodes analytiques représente l'un des outils du système qualité permettant aux industries pharmaceutiques d'avoir l'assurance que les résultats obtenus par le laboratoire de contrôle sont fiables, et ainsi d'avoir confiance dans la qualité des produits libérés. C'est un exercice réglementaire encadré par des référentiels tels que l'ICH Q2(R1) ou les *Guidelines* de la *Food and Drug Administration* (FDA) et de l'*European Medicine Agency* (EMA). Cependant, ces textes restent théoriques et il est peu courant de rencontrer des exemples concrets présentant chaque étape d'une validation analytique. De plus, les industriels doivent adapter leur démarche à chaque méthode en fonction des objectifs et performances attendus et des caractéristiques du produit à analyser. Lors de la validation des méthodes d'analyses microbiologiques, il faut ajouter à cela le fait que les paramètres définis par les différents guides des agences réglementaires ne sont pas toujours bien adaptés à la microbiologie. L'objectif de ce travail est de présenter des éléments clés pour la validation des méthodes d'analyses microbiologiques, qu'il s'agisse de méthodes de référence utilisées depuis longtemps par les analystes ou de nouvelles méthodes, souvent plus rapides que les méthodes standard. Puis à travers l'exemple de la validation d'une méthode de détermination de la biocharge (*bioburden*) avant filtration stérilisante, cette thèse illustre la validation d'une méthode de dénombrement microbien de référence, réalisée en suivant l'essai d'applicabilité décrit par la monographie de la Pharmacopée européenne et les exigences relatives à toute validation.

MOTS-CLÉS : industrie pharmaceutique, BPF, contrôle qualité, validation des méthodes d'analyse, microbiologie, Pharmacopée, méthode alternative, méthode de référence, biocharge avant filtration stérilisante